



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**

**EFFECTO DE LA PRESERVACIÓN EN FRÍO  
SOBRE EL RECHAZO CRÓNICO EN EL  
MODELO DE TRASPLANTE DE  
EXTREMIDAD POSTERIOR EN RATAS**

**Memoria presentada por**  
**Jorge Bonastre Juliá**

**Para optar al grado de Doctor en Medicina**

**2015**





**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**

**EFFECTO DE LA PRESERVACIÓN EN FRÍO  
SOBRE EL RECHAZO CRÓNICO EN EL  
MODELO DE TRASPLANTE DE  
EXTREMIDAD POSTERIOR EN RATAS**

**Memoria presentada por**  
**Jorge Bonastre Juliá**

**Directores:**  
**Dr. Luis Landín Jarillo**  
**Dr. César Casado Pérez**

**2015**





**FACULTAD DE MEDICINA, DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA.**

El **DR. LUIS LANDÍN JARILLO**, Facultativo Especialista de Área del Servicio de Cirugía Plástica y Quemados del Hospital Universitario La Paz, **como codirector**;

El **DR. CESAR CASADO PÉREZ**, Jefe del Servicio de Cirugía Plástica y Quemados del Hospital Universitario La Paz, **como codirector**; y

El **DR. CESAR CASADO SÁNCHEZ**, Profesor Asociado del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, y Facultativo Especialista de Área del Servicio de Cirugía Plástica y Quemados del Hospital Universitario La Paz, **como tutor**;

**HACEN CONSTAR** que **D. JORGE BONASTRE JULIÁ** ha elaborado bajo su dirección la Tesis Doctoral titulada “Efecto de la preservación en frío sobre el rechazo crónico en el modelo de trasplante de extremidad posterior en ratas”, con la finalidad de proceder a su lectura y defensa, una vez esté concluida al cumplir las exigencias académicas pertinentes.

Fdo.: Dr. César Casado Pérez

Fdo.: Dr. Luis Landín Jarillo

Fdo.: Dr. César Casado Sánchez



*A María, mi mujer.*

*A nuestra hija Inés.*





## **AGRADECIMIENTOS**

A María, mi mujer, por aguantar y sufrir con paciencia las horas invertidas en la realización de esta tesis, por animarme cuando el modelo no salía bien y darme fuerzas para volverlo a intentar nuevamente.

Al Dr. Luis Landin Jarillo, por su apoyo, orientación, dirección y ánimo en los momentos más duros de este trabajo. Por esas “horas de experimental”. Muchas gracias, volvería a embarcarme.

Al Dr. César Casado Pérez, por animarme, por su apoyo y facilitar enormemente el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. César Casado Sánchez, por sus ánimos y desánimos, y por esa ayuda inestimable para acabar de dar cuerpo a este trabajo.

A la Dra. Carlota Largo Aramburu, por las lecciones sobre anestesia animal y cuidado en el manejo de las ratas.

Al Dr. Eduardo López Collazo, por ayudarme a sacar adelante el proyecto, dejarme usar la infraestructura de su equipo y aclarar mis dudas trascendentales de inmunología y ciencias básicas.

A Pablo y a Pedro, por quedar conmigo cada día a las 07:25 horas de la mañana para pinchar a las ratas y ayudarme cuando yo no podía.

A la Dra. Mayte Vallejo, por ayudarme con el procesado de las muestras y enseñarme a usar el software del microscopio.

A mis compañeros, residentes todos en su momento: Sergio Álvarez, Álvaro González y Pedro Bolado, por ayudarme los días de guardia y apoyarme en el experimental.

A todas aquellas personas que con pequeños gestos me facilitaron la realización de esta tesis tan trabajada. A la gente del experimental por dar sabios consejos a un cirujano plástico perdido en las básicas y por ayudarme a graduar el microscopio.

# TABLA DE CONTENIDOS

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>1</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
1.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS. ....	7
1.2 TRASPLANTES DE TEJIDOS COMPUESTOS.....	9
1.3 INMUNOLOGÍA DE LOS TRASPLANTES. ....	15
1.3.1 El complejo mayor de histocompatibilidad. ....	15
1.3.2 Linfocitos T: el modelo de la triple señal. ....	17
1.3.3 Rechazo celular y rechazo humoral.....	19
1.3.4 Rechazo agudo.....	25
1.3.5 Regulación del rechazo por las citoquinas. ....	29
1.3.6 Inmunosupresión: inhibidores de la calcineurina. ....	34
1.4 RECHAZO CRÓNICO. ....	39
1.4.1 Concepto.....	39
1.4.2 Etiopatogenia, bases moleculares.....	40
1.4.3 Histopatología del rechazo crónico. ....	54
1.4.4 Diagnóstico.....	61
1.4.5 Opciones terapéuticas. ....	65
1.5 RECHAZO CRÓNICO EN LOS TTC.....	71
<b>2 OBJETIVO E HIPÓTESIS. ....</b>	<b>77</b>
<b>3 MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>81</b>
3.2 ESTUDIO HISTOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO.....	91
3.3 EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS CITOQUINAS.....	99

3.4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	103
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>105</b>
4.1	RESULTADOS DEL PROTOCOLO QUIRÚRGICO.....	107
4.2	RESULTADOS HISTOLÓGICOS Y RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICOS.....	109
4.2.1	Resultados de la vasculopatía crónica del aloinjerto.....	109
4.2.2	Resultados de la fibrosis.....	115
4.2.3	Resultados del infiltrado leucocitario.....	115
4.2.4	Resultados de la valoración del rechazo humoral.....	117
4.3	RESULTADOS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS CITOQUINAS...	121
<b>5</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>123</b>
5.1	LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	143
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>145</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>149</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>177</b>
9.1	PREMIOS DERIVADOS DE LA PRESENTE TESIS.....	181
9.2	BECAS CONCEDIDAS A LA PRESENTE TESIS.....	181
9.3	PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA PRESENTE TESIS .....	183
9.4	COMUNICACIONES A CONGRESOS DERIVADAS DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL.....	211
9.5	NOTAS, PERMISOS Y DERECHOS DE AUTOR.....	213

# ABREVIATURAS

- ADN: ácido desoxirribonucleico.
- ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario.
- AED: anticuerpos con especificidad para el donante.
- AMPc: adenosín monofosfato cíclico.
- ARN: ácido ribonucleico.
- ARNm: ácido ribonucleico mensajero.
- ATP: adenosín trifosfato.
- AZA: azatioprina.
- BMU: biomicroscopía ultrasónica.
- CsA: ciclosporina A.
- CMH: complejo mayor de histocompatibilidad.
- CMV: citomegalovirus.
- CPA: célula presentadora de antígenos.
- DASH: en inglés, *disabilities of the arm, shoulder and hand*; discapacidades del hombro, codo y mano.
- DIR: daño por isquemia-reperfusión.
- DPO: día postoperatorio.
- EEUU: Estados Unidos de América.
- Fc: fracción constante de los anticuerpos.
- FK-BP: en inglés, *FK-506-binding protein*; proteína de unión al FK-506.
- GM-CSF: en inglés, *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*; factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.
- GTP: guanosín trifosfato.
- H-E: hematoxilina – eosina.

- HLA: en inglés, *human leukocyte antigen*; antígeno leucocitario humano.
- HMGB1: en inglés, *chromatin-associated protein high-mobility group box 1*; proteína de alta movilidad del grupo 1 asociada a la cromatina.
- HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A.
- HPLC: en inglés, *high performance liquid chromatography*; cromatografía líquida de alta eficacia.
- HSP: en inglés, *heat shock protein*; proteína de choque térmico.
- HTA: hipertensión arterial.
- ICN: inhibidor de la calcineurina.
- Ig: inmunoglobulina.
- IHQ: inmunohistoquímico/a.
- IL: interleuquina.
- INF: interferón.
- K: potasio.
- KDa: kilodaltons.
- LBN RT1<sup>n</sup>: rata Lewis Brown-Norway.
- LDL: en inglés, *low density lipoproteins*; lipoproteínas de baja densidad.
- LEW RT1<sup>l</sup>: rata Wistar-Lewis.
- MAP quinasa: proteína quinasa activada por mitógenos.
- 6-MP: 6-mercaptopurina.
- MCP-1: en inglés, *monocyte chemoattractant protein-1*; proteína quimiotáctica de los monocitos-1.
- Mg: magnesio.
- µm: micrómetro o micra.
- MMF: micofenolato mofetilo.

- mTOR: en inglés, *mammalian target of rapamycin*; diana de la rapamicina de los mamíferos.
- Na: sodio.
- NF-AT: en inglés, *nuclear factor AT*; factor nuclear-AT.
- NK: en inglés, *natural killer*; asesino natural.
- NO: óxido nítrico.
- PAF: en inglés, *platelet activating factor*; factor activador de plaquetas.
- PAS: en inglés, *periodic acid Schiff*; ácido peryódico de Schiff.
- PG: prostaglandina.
- PI: proliferación intimal.
- PMAD: patrones moleculares asociados al daño.
- PMAP: patrones moleculares asociados a patógenos.
- PMN: polimorfonucleares.
- PO: postoperatorio.
- PPA: porcentaje de permeabilidad arterial.
- PSL: proteínas secretadas sin líder.
- Q-PCR: en inglés, *quantitative polymerase chain reaction*; reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.
- RA: rechazo agudo.
- RAF: en inglés, *Royal Air Force*; fuerza aérea real.
- RAGE: en inglés, *receptor for advance glycation end products*; receptor para productos finales de glicosilación avanzada.
- RC: rechazo crónico.
- RHA: rechazo hiperagudo.
- RLO: radicales libres de oxígeno.

- RLT: receptor de los linfocitos T.
- RM: resonancia magnética.
- RMA: rechazo mediado por anticuerpos.
- ROM: en inglés, *range of motion*: rango de movilidad.
- RR: riesgo relativo.
- RRP: receptores de reconocimiento de patrones.
- RTT: receptor tipo Toll.
- S.C.: vía subcutánea.
- SPECT: en inglés, *single photon emission computed tomography*; tomografía computarizada por emisión de fotón único.
- SSF: suero salino fisiológico.
- SUW: solución de preservación de la Universidad de Wisconsin.
- Tac ó FK-506: tacrolimus.
- TAC: tomografía axial computerizada.
- TGF- $\beta$ : en inglés, *transforming growth factor beta*; factor de crecimiento tumoral beta.
- TNF: en inglés, *tumor necrosis factor*; factor de necrosis tumoral.
- TOS: trasplante de órgano sólido.
- TTC: trasplante de tejidos compuestos.
- $t_{1/2}$ : semivida.
- VCA: vasculopatía crónica del aloinjerto.
- VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.



## **1 INTRODUCCIÓN.**



## **1.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS.**

El deseo recuperar las extremidades perdidas y reparar las mutilaciones faciales es tan antiguo como la humanidad. Lo representan mitos como la historia de los gemelos del siglo III, San Cosme (médico) y San Damián (cirujano), que alrededor del 286 d.C. realizaron el milagro de extirpar una pierna gangrenada a un anciano sacristán mientras dormía y sustituirla por la de un moro etíope. Los santos trasplantaron la pierna, y el sacristán al despertarse pudo andar con su extremidad sanada<sup>1,2</sup>.

La moderna biología de los trasplantes no empezó a desarrollarse hasta la segunda guerra mundial, ante la necesidad de tratar las graves secuelas de las quemaduras sufridas, tanto por los marinos aliados tras los ataques de los U-boat alemanes durante la “Operación León Marino”, como por los pilotos de la Royal Air Force (RAF) en su enfrentamiento con la Luftwaffe alemana en la “Battle of Britain”<sup>3</sup>. Con el objetivo de trasplantar piel de donantes cadáveres a los pacientes quemados, Medawar (biólogo) se unió a Gibson (cirujano plástico) en la Unidad de Cirugía Plástica del Hospital de Glasgow, Escocia, donde se trataban estos pacientes. Sus experimentos pioneros sobre la inmunología de los trasplantes, así como su posterior trabajo sobre la tolerancia inmunológica adquirida, le valieron a Medawar el título de Caballero del Imperio Británico y posteriormente el Premio Nobel de Medicina en 1960<sup>4</sup>.

Las limitaciones en el campo del trasplante de piel a nivel experimental, llevaron al desarrollo de líneas de investigación enfocadas al trasplante de órgano sólido (TOS), entre las que el trasplante renal era de las más prometedoras. En 1954 el cirujano plástico Joseph E. Murray, junto con Merrill y Harrison, realizaron en Boston el primer trasplante renal singénico con éxito entre gemelos genéticamente idénticos<sup>5,6</sup>. Este mismo equipo realizó también con éxito 5 años después el primer alotrasplante renal

entre gemelos no idénticos, empleando como terapia de inducción la irradiación corporal total<sup>7</sup>. Exceptuando este caso, el éxito en los alotrasplantes no fue posible hasta nacimiento de la moderna inmunosupresión farmacológica, que empezó en 1960 con los estudios sobre la 6-mercaptopurina (6-MP), un análogo de la purina, por Zukoski y Calne<sup>8,9</sup>. Posteriormente el desarrollo de la azatioprina (AZA), un precursor de la 6-MP, hizo posible la aplicación clínica de los alotrasplantes, y en 1962 Murray y Calne realizaron con éxito varios trasplantes renales de donante cadáver<sup>10-12</sup>. En diciembre de 1967 Barnard y su equipo realizaron el primer alotrasplante cardiaco de la historia en Cape Town (Sudáfrica). Pese al éxito inicial el paciente falleció a los 18 días postoperatorios (DPO) por una neumonía severa bilateral<sup>13,14</sup>. En 1968 Barnard realizó un segundo trasplante cardiaco, que fue el primero del mundo en abandonar con éxito el hospital falleciendo a los 19 meses de la intervención<sup>15</sup>. En este contexto histórico también se sitúa el descubrimiento de otro inmunosupresor fundamental para el desarrollo de la ciencia de los alotrasplantes, la ciclosporina A (CsA), un inhibidor de la calcineurina (ICN). Borel descubrió en una muestra de suelo noruego en 1976 la actividad inmunosupresora de la CsA, producida por el hongo *Tolypocladium inflatum*<sup>16</sup>. Durante el último tercio del siglo XX, gracias a los avances en los regímenes inmunosupresores, también se realizaron los primeros alotrasplantes de hígado<sup>17,18</sup>, pulmón<sup>19,20</sup>, páncreas<sup>21</sup> e intestino delgado<sup>22</sup>. Murray recibió el Premio Nobel de Medicina en 1990 “por sus descubrimientos acerca del trasplante celular y de órganos en el tratamiento de enfermedades humanas”<sup>23</sup>.

## **1.2 TRASPLANTES DE TEJIDOS COMPUESTOS.**

Los trasplantes de tejidos compuestos (TTC) son una modalidad de transferencia tisular en la que se incluyen tejidos de distintas estirpes inmunológicas. El trasplante de mano es quizás el paradigma del TTC, incluyendo tejido muscular, tendinoso, óseo, nervioso, vascular y cutáneo. La escasez de donantes adecuados con características morfológicas similares al receptor, y la urgencia del procedimiento, hace que los TTCs se realicen sin tipaje ni apareamiento del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) preoperatoriamente.

El primer TTC documentado en humanos fue realizado en Ecuador en 1964. Coincidiendo con el éxito del primer alotrasplante renal, Gilbert realizó un trasplante de mano unilateral de donante cadáver a un paciente con una amputación bilateral secundaria a una explosión<sup>24</sup>. La terapia inmunosupresora empleada en ese caso incluyó AZA y prednisona. Lamentablemente la presencia de un episodio de rechazo agudo (RA) irreversible requirió la amputación del aloinjerto a la 3ª semana postoperatoria (PO)<sup>25</sup>. Este y otros fracasos en el campo de los TTC experimentales, llevó a la comunidad científica a concluir que la piel era demasiado antigénica para poder controlar los episodios de rechazo con inmunosupresores, y por tanto para ser trasplantada con seguridad<sup>26</sup>. Durante más de 30 años no se realizó ningún trasplante de mano ni otro tipo de TTC. Sin embargo la moderna inmunosupresión continuó desarrollándose, y al descubrimiento de la CsA por Borel en 1976 hay que añadir el del tacrolimus o FK-506 por Goto en 1987 y el del micofenolato mofetilo (MMF), un análogo de la purina, en 1993<sup>16,27,28</sup>. Todos estos avances llevaron a la aplicación con éxito de un protocolo de MMF con CsA, previamente aplicado con éxito en trasplante renal y cardíaco<sup>29,30</sup>, en modelos experimentales de trasplante de pata posterior en rata

que incluían piel<sup>31</sup>. Estos estudios se confirmaron posteriormente en modelos preclínicos de TTC porcinos<sup>32,33</sup>.

Hofmann y su equipo fueron pioneros en la aplicación clínica del alotrasplante de rodilla en Murnau (Alemania), realizando los primeros cuatro trasplantes entre 1996 y 1997<sup>34,35</sup>. Tres de las reconstrucciones alogénicas realizadas por Hofmann fueron para defectos diafisarios femorales, mientras que las otras seis fueron aloinjertos completos de rodilla<sup>35</sup>. En ninguno de los casos se emplearon testigos cutáneos, excepto en el último receptor que sí poseía una isla de piel<sup>36</sup>. Lamentablemente, aunque todas las intervenciones fueron exitosas y el postoperatorio a corto-medio plazo prometedor, ninguno de los aloinjertos sobrevivió más de 56 meses<sup>37</sup>.

La primera reunión enfocada abiertamente a la aplicación clínica de los TTCs fue en Louisville (EEUU) en 1997. Allí tuvo lugar el “Primer Simposio Internacional en Trasplante de Tejidos Compuestos”, que reunió a inmunólogos y cirujanos de diferentes partes del mundo con el fin de iniciar un programa para la realización de TTCs. Un año después, Strome en Cleveland (EEUU) realizó el primer alotrasplante clínico de laringe con éxito del mundo<sup>38</sup>. El receptor era un varón de 40 años que había perdido las estructuras faringo-laríngeas de manera traumática 20 años antes, resultando en una afonía completa y dependencia de traqueostomía. El aloinjerto incluyó todas las estructuras faringo-laríngeas, 6 anillos traqueales, la glándula tiroides y las paratiroides. Al tercer DPO el paciente pronunció su primera palabra, y transcurridos 9 años los resultados funcionales y la satisfacción del paciente con el trasplante fueron excelentes<sup>39</sup>. El receptor posee una voz humana, con su timbre e inflexiones características, y puede respirar y tragar con normalidad<sup>40,41</sup>. Tras las experiencias iniciales de Strome, el trasplante de laringe sufrió una gran expansión gracias al trabajo de Tintinago en Medellín (Colombia). En 2007 había realizado más de 13 trasplantes

laringotraqueales, siendo uno de ellos el primero del mundo en incluir componente esofágico en el aloinjerto<sup>42</sup>.

El 23 de septiembre de 1998, Dubernard y su equipo realizaron en Lyon (Francia) el primer trasplante de mano con éxito del mundo<sup>43</sup>. En enero de 1999 Breidenbach realizó en el Kleinert-Kutz Institute de Louisville el segundo trasplante unilateral de mano del mundo, que supone a día de hoy el TTC de más larga evolución, con más de 14 años de supervivencia<sup>44-46</sup>. El paciente recuperó la capacidad para realizar las actividades básicas de la vida diaria (abrir puertas, pasar las páginas de un periódico, tomar un vaso de agua), y sus resultados funcionales fueron clasificados como buenos. Recuperó la musculatura intrínseca y las mediciones objetivas realizadas fueron comparables a los resultados de un macrorreimplante<sup>46,47</sup>.

El 13 de enero del 2000, Dubernard y su equipo realizaron en Lyon el primer trasplante bilateral de manos<sup>48</sup>. En general los receptores de trasplantes de mano bilaterales han presentado una mejoría funcional superior a los receptores unilaterales, estimulando así el debate europeo sobre la indicación o no de los aloinjertos de mano unilaterales<sup>49,50</sup>. Landín describió que globalmente el resultado funcional de los trasplantados de manos ha sido bueno, con una mejora media respecto a la puntuación preoperatoria del Disabilities of the Arm, Shoulder and Hand (DASH) de 27,6 ( $\pm 19,04$ ) de manera estadísticamente significativa ( $P = 0,005$ ). Además, el 70% de los pacientes trasplantados ha presentado una mejora en la puntuación DASH de más de 15 puntos, lo cual supone un mejor estado funcional de la extremidad respecto a su nivel preoperatorio<sup>51,52</sup>. Hasta el momento se han realizado más de 80 trasplantes de extremidad superior en el mundo<sup>43,44,46-48,53-84</sup>.

En 2006 Zuker realizó en Toronto (Canadá) el primer trasplante singénico unilateral de pierna entre unos gemelos siameses isquiópagos de 3 meses de edad, no necesitando por tanto tratamiento inmunosupresor<sup>85</sup>. Actualmente la paciente puede deambular con la ayuda de una rodillera, correr distancias cortas y saltar. La resonancia magnética (RM) funcional demostró integración de la extremidad trasplantada a nivel del córtex motor<sup>86</sup>. El primer caso de trasplante alogénico de piernas lo realizó Cavadas y su equipo en julio de 2011 en Valencia (España). El receptor era un varón de 22 años con una amputación bilateral por encima de la rodilla<sup>87</sup>. Funcionalmente, en su último informe el paciente presentó una flexo-extensión activa de la rodilla, flexión plantar y empezó a presentar también dorsiflexión del pie<sup>88</sup>.

El primer alotrasplante de cara del mundo fue realizado por Devauchelle y Dubernard en Amiens (Francia) en noviembre del 2005. La receptora era una mujer de 38 años, que tras el ataque de un perro sufrió una pérdida de las partes blandas de la región centrofacial. El aloinjerto incluyó los 2/3 inferiores de la cara, y también se realizó un colgajo antebraquial radial como testigo para monitorización y toma de biopsias en caso de episodios de rechazo<sup>89</sup>. A los 6 meses la paciente había recuperado la sensibilidad epicrítica en los labios, así como la discriminación termoalgésica. La recuperación motora fue más lenta, lográndose el cierre de ambos labios al 10º mes postoperatorio<sup>90</sup>. En marzo de 2010 Barret y su equipo realizaron en Barcelona el primer alotrasplante de la totalidad de la cara del mundo. El receptor era un varón de 30 años que presentaba importantes secuelas faciales como consecuencia de un accidente por arma de fuego en 2005. A los 12 meses PO presentó signos de una excelente recuperación funcional y sensitiva. Posteriormente se le han realizado cirugías secundarias de refinamiento, como una osteotomía tipo LeFort I, una blefaroplastia y una ritidectomía<sup>91-93</sup>.



En los últimos 15 años se han realizado más de 150 TTCs a lo largo de toda la anatomía<sup>94</sup>. Los éxitos iniciales en el campo de los TTCs han llevado a la organización de más de una docena de grupos y programas internacionales, cuyo objetivo es la realización de TTCs a nivel clínico. Al margen de los trasplantes iniciales de rodilla, laringe, manos, piernas y cara se han expandido las indicaciones y hoy en día se han realizado aloinjertos de tráquea<sup>95</sup>, lengua<sup>96</sup>, orejas y cuero cabelludo<sup>97</sup>, músculos y tendones<sup>98</sup>, nervios periféricos<sup>99</sup>, pared abdominal<sup>100</sup>, útero<sup>101</sup> y pene<sup>102,103</sup>. Los TTCs son actualmente una realidad clínica y una opción de tratamiento para defectos compuestos y heridas complejas con afectación de múltiples estructuras, alcanzando un nivel excelente de funcionalidad y resultado estético.



## **1.3 INMUNOLOGÍA DE LOS TRASPLANTES.**

### **1.3.1 El complejo mayor de histocompatibilidad.**

El reconocimiento del tejido trasplantado como algo extraño desemboca en un rechazo inmunológico con una respuesta defensiva apropiada. El responsable de ese reconocimiento es la interacción entre los linfocitos T y el CMH, o human leukocyte antigen (HLA), que está codificado en los distintos genes del brazo corto del cromosoma 6. La composición del CMH está determinada por seis lugares (locii) dentro de este locus, que codifican moléculas de superficie de dos tipos: clase I (HLA-A, -B y -C) y clase II (HLA-DR, -DP y -DQ). El CMH tipo I (HLA-I) se expresa de manera constitutiva en todas las células nucleadas del organismo y sirve para presentar antígenos propios del interior celular. El CMH tipo II (HLA-II) sólo lo expresan las células presentadoras de antígenos (CPAs), los linfocitos B, los linfocitos T activados y las células del endotelio vascular. Su función es presentar antígenos ajenos al organismo combinados con las moléculas del CMH-II previo procesamiento de los mismos a nivel intracelular<sup>104</sup>. La expresión de las moléculas del CMH a nivel celular está regulada por varias citoquinas, pudiéndose estimular por interferones (INF) y factores de necrosis tumoral (TNF). Éstos son potentes inductores de la expresión de los CMH a nivel de las distintas estirpes celulares, como las del endotelio vascular<sup>105</sup>. Cuando donante y receptor se diferencian en los antígenos del CMH, los aloinjertos son rechazados a menos que el receptor se someta a terapia inmunosupresora<sup>106</sup>. El grado en que un aloinjerto comparte antígenos del CMH con el receptor se denomina histocompatibilidad.

En los episodios de rechazo un componente del sistema inmunitario reconoce alguna parte del aloinjerto como ajena<sup>107,108</sup>. Todos los aloinjertos expresan sus antígenos en forma de moléculas de clase I y II<sup>106</sup>. En los TTCs, los antígenos en forma de CMH-II se encuentran fundamentalmente en las células dendríticas de la piel, los leucocitos pasajeros, los macrófagos y los órganos linfoides secundarios, donde drenan los antígenos que se hayan presentado y donde tiene lugar la respuesta inmune primaria.

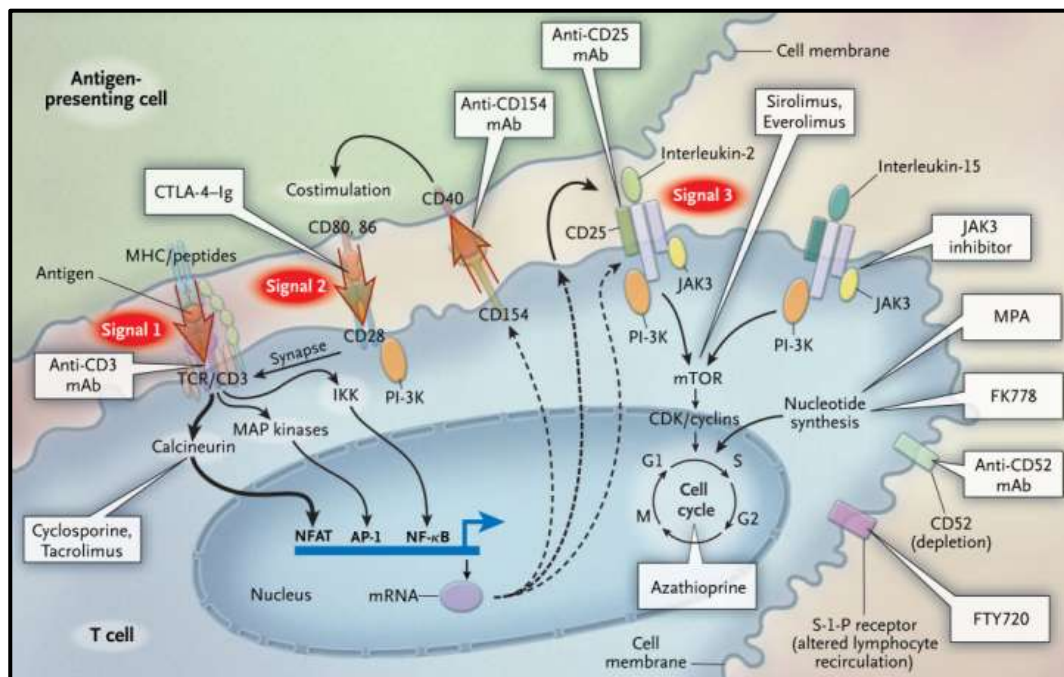
El fenómeno que inicia la respuesta de rechazo del aloinjerto es el reconocimiento de las moléculas del CMH por parte del receptor de los linfocitos T (RLT)<sup>109</sup>. A diferencia de los anticuerpos, que pueden unirse a cualquier molécula ajena al individuo, el RLT reconoce específicamente los péptidos que conforman el CMH. Por tanto, la activación de los linfocitos T depende de que el RLT identifique el CMH<sup>110</sup>.

### 1.3.2 Linfocitos T: el modelo de la triple señal.

Los linfocitos T se generan fundamentalmente en el timo, donde van a madurar y a desarrollarse. Es ahí donde los linfocitos T precursores adquieren la capacidad de reconocer antígenos por medio de receptores de superficie altamente especializados, responsables también del linaje celular. El RLT es un heterodímero compuesto por dos cadenas polipeptídicas, que al combinarse dan lugar a los dos tipos fundamentales de linfocitos T: los  $\alpha$ - $\beta$  y los  $\gamma$ - $\delta$ . El RLT se encuentra en la membrana celular asociado a una serie de moléculas peptídicas que forman el complejo CD3, implicado en la transmisión de señales a nivel intracelular. Los linfocitos T  $\alpha$ - $\beta$  están implicados en la mayor parte de las respuestas inmunitarias del organismo, mientras que los linfocitos T  $\gamma$ - $\delta$  se involucran sólo en las respuestas antigénicas complejas, como las infecciones virales, bacterianas y la actividad antitumoral<sup>111</sup>. Las células  $\alpha$ - $\beta$  maduras se subdividen en dos poblaciones distintas: una portadora de la molécula CD4, que fundamentalmente ayuda o induce las respuestas inmunitarias (“helper”), y otra población con la molécula CD8 con una función citotóxica.

La activación de los linfocitos T se debe a una secuencia de pasos conocida como el “modelo de la triple señal” (ver *Figura 1*)<sup>112</sup>. Primero tiene lugar el reconocimiento por parte del linfocito T de los antígenos del donante presentados en forma de CMH en la superficie de una CPA. La interacción del RLT con el CMH constituye la “primera señal” y se transmite al medio intracelular a través del complejo CD3. La CPA también proporciona la señal coestimuladora o “segunda señal”, cuando sus moléculas de superficie CD80 o CD86 se unen a su ligando CD28 presente en la membrana del linfocito T del receptor. El reconocimiento antigénico (“primera señal”) en ausencia de esta señal coestimuladora produce un estado de tolerancia conocido como anergia. En caso de producirse ambas señales se activan tres vías de transducción intracelular: la vía

calcio-calcineurina, la vía RAS de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAP) y la vía del factor nuclear  $\kappa B$ <sup>113</sup>. Estas vías activan la transcripción de factores que aumentan la expresión de moléculas como la interleuquina 2 (IL-2), CD154 y CD25. La IL-2 y otras citoquinas como la IL-15, activan la “tercera señal” o vía de la diana de la rapamicina de los mamíferos (mTOR), que desencadena la diferenciación del linfocito T y la expansión clonal<sup>114</sup>. La importancia de los linfocitos T en el rechazo ha sido reconocida en diversos modelos experimentales de trasplante empleando animales genéticamente modificados con linfocitos T ausentes o sin capacidad funcional (“knock down”)<sup>115-117</sup>. Los linfocitos T alorreactivos activados, fundamentalmente CD4, liberarán citoquinas proinflamatorias responsables del rechazo del aloinjerto dependiente de los linfocitos T<sup>118</sup>.



**Figura 1. Dianas de los fármacos inmunosupresores integradas en el modelo de la triple señal.** Las tres señales aparecen marcadas en rojo (signal). Antigen-presenting cell: célula presentadora de antígenos; mAb: anticuerpo monoclonal; T cell: célula T; MHC/peptides: complejo mayor de histocompatibilidad/péptidos; TCR: receptor de linfocito T; synapse: sinapsis; nucleus: núcleo; costimulation: coestimulación; cell membrane: membrana celular; signal: señal; interleukin: interleuquina; inhibitor: inhibidor; nucleotide synthesis: síntesis de nucleótidos; cell cycle: ciclo celular; depletion: depleción; mTOR: diana de la rapamicina de los mamíferos; MPA: ácido micofenólico; NF: factor nuclear (Reproducido con permiso: Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. N Engl J Med 2004;351:2715-29, Copyright Massachusetts Medical Society).

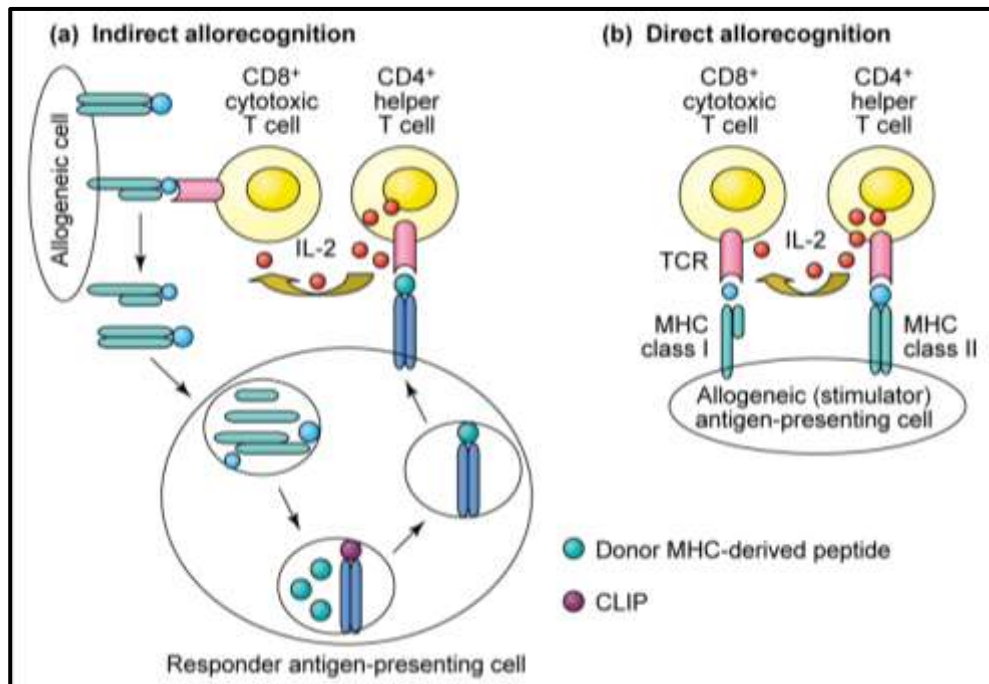
### 1.3.3 Rechazo celular y rechazo humoral.

Las diferencias genéticas entre donante y receptor son las responsables de que el sistema inmunitario del receptor reconozca al aloinjerto como ajeno, y desencadene una respuesta de rechazo que puede destruir el trasplante. A pesar de que los TTCs están compuestos por tejidos diferentes con diversos grados de antigenicidad, hoy se asume que la respuesta inmunitaria está mediada por mecanismos similares a los del rechazo en TOS.

La respuesta inmunitaria de rechazo celular está mediada por los linfocitos T, y tiene como objetivo fundamental reconocer las moléculas del CMH no propias y destruir las células del órgano trasplantado que las presenten<sup>119</sup>. La intensa respuesta celular T que se produce tras el reconocimiento de los antígenos del aloinjerto en forma de CMH, llevará al rechazo de los tejidos trasplantados. Los antígenos del donante son reconocidos por los linfocitos T alorreactivos mediante dos vías distintas, aunque no mutuamente excluyentes: la vía directa y la indirecta. La vía directa tiene lugar cuando las células T del receptor reconocen directamente péptidos del aloinjerto en moléculas intactas del CMH de las CPAs del donante. Por el contrario, la vía indirecta requiere que las CPAs del receptor procesen previamente los complejos péptido-CMH del donante, previa a la presentación de forma selectiva a los linfocitos T del receptor (ver *Figura 2*). Clásicamente se ha separado ambas vías de reconocimiento, asociándose la vía directa con el inicio de la respuesta inmunitaria y el RA, mientras que la vía indirecta se relacionaba con el rechazo crónico (RC). Hoy en día se sabe que ambas vías no son mutuamente excluyentes, ya que ambas están relacionadas con el desarrollo del rechazo, ya sea de manera simultánea o en las distintas fases de éste<sup>120</sup>. En un trabajo reciente de Pietra sobre trasplante cardíaco, se emplearon como receptores ratones inmunodeficientes y “knock-down” para CMH clase II, realizándose trasplantes

cardiacos heterotópicos de donantes con/sin CMH clase II. Se reconstituyó posteriormente a los receptores con linfocitos T CD4<sup>+</sup>, observándose el desarrollo de episodios de RA en los aloinjertos con expresión del CMH tipo II. Como estos ratones no tenían capacidad CD8<sup>+</sup> y no podían desarrollar el reconocimiento antigénico por la vía indirecta al carecer de CMH tipo II propio, se demostró que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> eran necesarios y suficientes para desarrollar respuestas de RA contra los aloinjertos cardiacos, y que dicha respuesta requería la expresión del CMH tipo II del donante (pero no el del receptor), indicando que la vía inmunitaria directa era la implicada de forma exclusiva en esta respuesta<sup>121</sup>. De igual forma, Auchincloss realizó trasplantes de aloinjertos cutáneos empleando ratones “knock-out” para el CMH tipo I como receptores y para el CMH tipo II como donantes. Los animales receptores también sufrieron una depleción de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, y por tanto eran incapaces de reconocer los aloantígenos en forma de CMH clase I de forma directa. Como los aloinjertos también carecían de CMH tipo II, la activación por la vía directa de los CD4<sup>+</sup> tampoco era posible. El fenómeno de rechazo que se observó en los aloinjertos se produjo por la vía indirecta exclusivamente, ya que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> del receptor sólo pudieron ser estimulados por los aloantígenos en forma de CMH tipo II tras ser previamente procesados por sus propias CPAs. Estos datos indicaron que la vía indirecta también es suficiente y puede por sí misma activar la respuesta inmunitaria ante un aloinjerto<sup>122</sup>.





**Figura 2. Reconocimiento antigénico: vía directa e indirecta.** Allogeneic cell: célula alogénica; responder antigen-presenting cell: célula presentadora de antígenos efectora; allogeneic stimulator antigen-presenting cell: célula presentadora de antígenos alogénica estimulante; donor MHC-derived peptide: péptido derivado del CMH del donante (Reproducido con permiso: Jiang S, Herrera O, Lechler RI. New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance. Curr Opin Immunol. 2004;16(5):550-7, Copyright Elsevier).

Los linfocitos T  $CD4^{+}$  activados por el reconocimiento de los aloantígenos, contribuyen al rechazo celular de tres formas distintas: primero, generando señales que estimulan la producción de células T  $CD8^{+}$ ; segundo, activando leucocitos efectores antígeno-independientes para aumentar la reacción inflamatoria y el daño tisular; y tercero, produciendo señales que estimulen la diferenciación y activación de los linfocitos B  $CD20^{+}$  productores de aloanticuerpos o anticuerpos con especificidad para el donante (AED)<sup>123</sup>.

El primero de los mecanismos efectores de las células T  $CD4^+$  es estimular la expansión clonal de los linfocitos T  $CD8^+$  o citotóxicos. Esto lo consiguen de dos formas diferentes, primero produciendo IL-2 que estimula de manera directa a las células  $CD8^+$ , y segundo, activando a las CPAs para que sean éstas las que estimulen la diferenciación y expansión clonal de los linfocitos T precursores a linfocitos T citotóxicos en los órganos linfoides secundarios. La función primaria de las células citotóxicas es causar daño tisular a través de la citólisis de las distintas estirpes celulares del aloinjerto. Esta citólisis dirigida se desencadena con la presentación directa de aloantígenos en forma de CMH tipo I a las células citotóxicas alorreactivas, sin afectar al resto de estirpes celulares. Biedermann sugirió que las células endoteliales del donante estimulan a los linfocitos T  $CD8^+$  precursores para que se diferencien a una subclase de linfocito T citotóxico que atacaría de manera exclusiva y preferente al endotelio vascular del aloinjerto, sin embargo su papel exacto en los episodios de RA o en el desarrollo del RC no está todavía claro<sup>124,125</sup>.

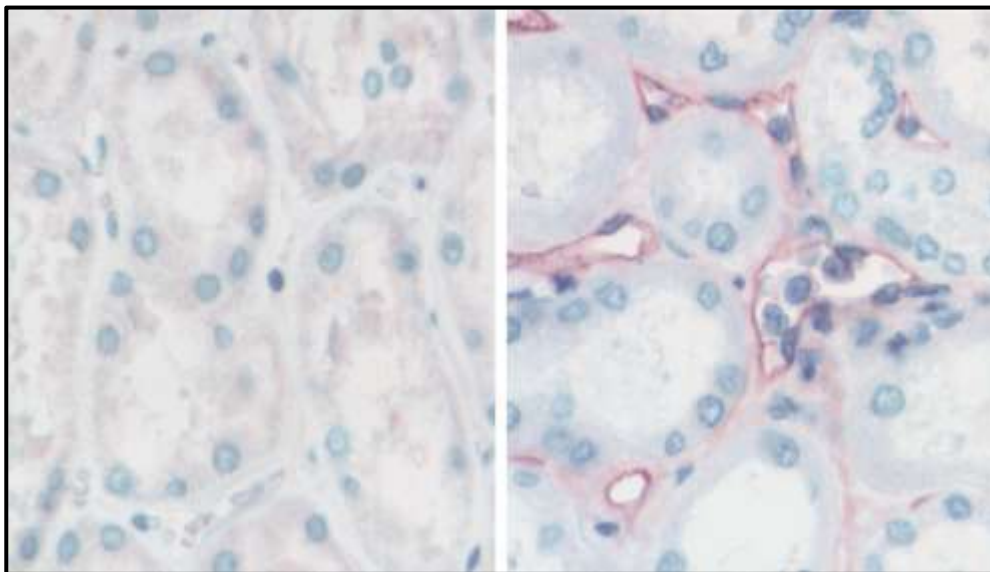
El segundo mecanismo efector del rechazo celular es la activación de leucocitos antígeno-independientes. Los macrófagos activados  $CD68^+$  son los efectores mejor caracterizados dentro de este grupo. Los macrófagos producen daño tisular al aloinjerto mediante la liberación de radicales libres de oxígeno, así como con la producción de óxido nítrico (NO) y de enzimas histolíticas. Las manifestaciones más características de este mecanismo son el infiltrado perivascular y tisular por los macrófagos, inflamación y frecuentemente fenómenos de trombosis vascular.

El tercer mecanismo efector de la respuesta celular T CD4<sup>+</sup> es la producción de señales estimuladoras para la diferenciación y activación clonal de los linfocitos B CD20<sup>+</sup> productores de AED, relacionándose así directamente con el rechazo humoral. A pesar del papel central de los linfocitos T y del rechazo celular en la respuesta inmunitaria, la presencia de episodios de RA resistentes a los inmunosupresores actuales (cuya diana es la respuesta celular T), la detección de AED circulantes y el depósito de C4d en el aloinjerto, ponen de manifiesto la importancia del rechazo humoral. El C4d es un fragmento inactivo de C4 que se libera durante la activación de la vía clásica del complemento. El C4d contiene un grupo tiol reactivo que queda expuesto durante la activación del C4 y se une de manera covalente y duradera a las estructuras vecinas<sup>126,127</sup>. El grave daño vascular objetivado en los episodios de rechazo en TOS se ha atribuido a un mecanismo inmune de tipo humoral, donde con la unión de los aloantígenos a sus inmunoglobulinas de superficie, las células B CD20<sup>+</sup> comenzarán a proliferar y a diferenciarse hacia células plasmáticas. Las células plasmáticas liberarán AED que reaccionarán con los antígenos expresados en forma de CMH tipo I del aloinjerto provocando un daño celular dirigido, ya sea mediante la fijación del complemento o mediante citotoxicidad directa<sup>128</sup>.

El diagnóstico de un episodio de rechazo humoral requiere de cuatro criterios: evidencia clínica de la disfunción del aloinjerto (algo que todavía está por definir en los TTCs), evidencia histológica del daño tisular (vasculitis neutrofílica y/o necrosis fibrinoide), evidencia anatomopatológica del daño por anticuerpos mediante la identificación del fragmento del complemento C4d a nivel capilar (ver *Figura 3*), y evidencia serológica de AED en el momento de la biopsia<sup>129-132</sup>. Fedrigo describió recientemente que la acumulación de macrófagos intravasculares en las fases tempranas

de un trasplante cardiaco es un factor predictivo para la presencia de AED, depósitos de C4d y síntomas de rechazo humoral<sup>133</sup>.

El rechazo humoral puede manifestarse de dos formas distintas: rechazo hiperagudo y rechazo vascular. El rechazo hiperagudo se caracteriza por una arteritis necrotizante, con trombosis de la luz vascular e infarto del órgano trasplantado. Éste ocurre pocos minutos tras el trasplante y se debe a la presencia de AED preformados que activarán la vía clásica del complemento. La diferencia entre el rechazo hiperagudo y el rechazo a nivel vascular, es que el primero se produce en ausencia de estímulos inflamatorios o de elementos procoagulantes a nivel de la pared vascular, mientras que el segundo se produce a partir de éstos<sup>134-136</sup>.



**Figura 3. Identificación del fragmento del complemento C4d a nivel capilar.** *Izquierda:* biopsia renal sin signos de rechazo. *Derecha:* biopsia renal con signos de rechazo humoral. Se aprecia en los capilares peritubulares el depósito de C4d y el infiltrado por células mononucleares. (Reproducido con permiso: Mauiyyedi S, Colvin RB. Humoral rejection in kidney transplantation: new concepts in diagnosis and treatment. Current opinion in nephrology and hypertension. 2002;11(6):609-18. Epub 2002/10/24. Copyright Wolters Kluwer).

#### 1.3.4 Rechazo agudo.

Se han observado episodios de RA en todos los TTCs ocurriendo tras varios días/semanas del trasplante. Se caracterizan por un fenómeno inflamatorio patológico, reversible con una inmunosupresión temprana, que va a provocar daños endoteliales y vasculares en el aloinjerto<sup>137</sup>. El principal responsable de este fenómeno es la activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> al reconocer los compuestos péptido-CMH, que sirve como desencadenante para varios mecanismos efectores. Las células T CD4<sup>+</sup>, por medio de cambios en la expresión de sus moléculas de superficie y la liberación de citoquinas, estimularán a los monocitos para la destrucción del aloinjerto<sup>138</sup>. La acumulación de macrófagos CD68<sup>+</sup> en el aloinjerto se debe a la proliferación de los monocitos tisulares y al reclutamiento de los circulantes. La expresión de CD99 y de moléculas de adhesión como la P-selectina a nivel de las células endoteliales, facilita ese reclutamiento durante los episodios de RA en aloinjertos cardiacos<sup>139,140</sup>. De igual forma, se ha visto que las citoquinas que estimulan la respuesta inflamatoria están directamente relacionadas con el infiltrado macrofágico CD68<sup>+</sup> en trasplante renal<sup>141,142</sup>. Posteriormente los macrófagos perpetuarán la respuesta inmunitaria al liberar una mayor cantidad de citoquinas proinflamatorias, siendo los responsables del daño tisular mediante la liberación de radicales libres de oxígeno, eicosanoides y proteasas<sup>143</sup>.

Los CD4<sup>+</sup> también van a liberar citoquinas para estimular la proliferación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y las células “natural killer” (NK). El reconocimiento de las moléculas constitutivas del aloinjerto expresadas en forma de CMH-I por parte de los CD8<sup>+</sup> provocará la muerte celular mediante dos mecanismos distintos. El primero consiste en la liberación de factores citotóxicos solubles como el complejo granzima / perforina. El segundo, es una regulación al alza de la molécula Fas en la superficie del

linfocito T, que se unirá al ligando Fas (CD95) presente en la superficie de las células del aloinjerto, activando así la apoptosis celular<sup>144</sup>.

El RA se puede tratar de manera eficaz. La pérdida del órgano trasplantado por un episodio de RA es un fenómeno muy poco frecuente con la inmunosupresión moderna. Uno de los artículos publicados derivados de esta tesis describe que en trasplante de manos la tasa de episodios de RA es del 89%, teniendo cada receptor una media de 2,42 episodios durante su seguimiento, y ocurriendo el 60% de los mismos durante el primer semestre postoperatorio<sup>55</sup>. A pesar de la alta tasa de episodios de RA, explicable en parte por la inmunogenicidad de la piel<sup>26</sup>, todos los episodios fueron correctamente revertidos independientemente del protocolo anti rechazo empleado. La supervivencia de los receptores fue del 97,8%, con sólo un caso de fallecimiento del receptor a los 2 meses postoperatorios. Este paciente, con un trasplante combinado de cara y ambas manos, falleció debido a una infección por *Pseudomonas* y un sangrado arterial agudo<sup>68</sup>. Los episodios de RA deben ser tratados de forma inmediata, ya que la activación prolongada de los mecanismos inmunitarios efectores hace difícil el tratamiento a posteriori.

La prevención del rechazo humoral incluye la realización de una anamnesis completa al receptor, teniendo en cuenta posibles episodios de sensibilización previos, así como descartar la presencia de autoanticuerpos y realizar pruebas cruzadas para linfocitos T y B pre trasplante<sup>145</sup>. En la práctica clínica, el RA humoral en TOS se detecta tras una disfunción importante del órgano trasplantado, siendo el episodio típicamente resistente a los esteroides a altas dosis y las inmunoglobulinas antitimocito<sup>146,147</sup>. En caso de rechazo humoral resistente a corticoides, el tratamiento consiste en realizar plasmaféresis periódicas para retirar los AED circulantes y pautar un tratamiento inmunosupresor de rescate con Tac y MMF. Kimball describió en trasplante

renal de donante cadáver que el MMF inhibe la producción de anticuerpos a nivel de los linfocitos B tanto *in vitro* como *in vivo*, convirtiéndolo en una valiosa herramienta para el control del rechazo humoral<sup>148</sup>.

El grado de rechazo se mide con una biopsia cutánea<sup>149</sup>. Tras la “Novena conferencia sobre la patología de los aloinjertos” que tuvo lugar en junio de 2007 en La Coruña, se estableció una clasificación histopatológica común para valorar la gravedad de los episodios de RA en los TTCs basándose en los datos de la biopsia cutánea<sup>150</sup>. La clasificación Banff CTA-07 establece cinco grados de rechazo, que van desde el grado 0 con un mínimo infiltrado inflamatorio, al grado IV o rechazo agudo necrotizante, con presencia de necrosis franca de la epidermis y los anejos cutáneos. Vasculitis, dermatitis, miositis e infiltrados perineurales se pueden diagnosticar en los 4mm de espesor de un “punch” cutáneo, tomándolo siempre de la zona viable del aloinjerto con las manifestaciones cutáneas más virulentas<sup>151</sup>. El infiltrado celular de la biopsia suele ser mixto y no se limita únicamente a los linfocitos. El método de análisis es meramente descriptivo. Las recomendaciones para las preparaciones histopatológicas incluyen la tinción con hematoxilina – eosina (H-E) y con ácido peryódico de Schiff (PAS). Según los hallazgos en los cristales con H-E, o por fines científicos, también se recomienda un análisis inmunohistoquímico (IHQ) de las siguientes moléculas: CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD68, HLA-DR, citomegalovirus (CMV) y C4d<sup>152</sup>. No todo el infiltrado celular presente en el aloinjerto tiene características negativas o lesivas. Racusen y Hautz han estudiado la naturaleza de los infiltrados, y los linfocitos T reguladores CD4/CD25/Foxp3/CD127<sup>+</sup> presentes en la piel del aloinjerto hasta 6 años postrasplante parecen tener un efecto beneficioso<sup>153,154</sup>. Quedan aún cuestiones pendientes por resolver, cómo el significado que tiene la afectación de las distintas estructuras (anejos

cutáneos, vasos, tejido muscular...) en cuanto al pronóstico y gravedad del episodio de RA.



### 1.3.5 Regulación del rechazo por las citoquinas.

Las citoquinas son un grupo de polipéptidos secretados de origen celular que actúan como mediadores solubles en los episodios de rechazo. Son las moléculas responsables de la activación de la celularidad local (fibroblastos, células endoteliales, macrófagos tisulares y mastocitos), así como de los leucocitos reclutados (monocitos, linfocitos, neutrófilos y eosinófilos); definiendo así la naturaleza del infiltrado celular. Las citoquinas también están implicadas en la respuesta inflamatoria sistémica (fiebre, hipotensión, caquexia...). La mayoría de ellas actúa a distintos niveles y en dianas diferentes de manera autocrina y paracrina, presentan efectos tanto sinérgicos como antagónicos y un efecto global regulador tanto pro como antiinflamatorio. Estas moléculas proinflamatorias se pueden dividir a su vez según participen en el RA (IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6...) o en el crónico, ya sea mediando la respuesta humoral (IL-6) o la respuesta celular (IL-1, IL-10, TGF- $\beta$ ...). Hay que tener en cuenta que algunas citoquinas también participan en varias de estas respuestas, como la IL-1<sup>155</sup>.

#### *Citoquinas implicadas en la fase aguda del rechazo.*

##### *A. Factor de necrosis tumoral $\alpha$ y $\beta$ .*

Tanto el TNF- $\alpha$  como el TNF- $\beta$  se unen a un mismo receptor de membrana desencadenando efectos similares a nivel intracelular. El TNF- $\alpha$  y el  $\beta$  tienen un peso molecular aproximado de 17 y 25 Kilodaltons (KDa) respectivamente. Su ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) fue clonado en 1984 y los genes que lo codifican se han mapeado en el cromosoma 6 humano, en la misma región que también codifica al CMH<sup>156</sup>.

El TNF- $\alpha$  o cachectina, es una molécula producida por los macrófagos/monocitos activados, los fibroblastos, los mastocitos, algunas células T y las células NK<sup>157</sup>. El TNF- $\alpha$  y la IL-1 comparten propiedades proinflamatorias. Al igual que la IL-1 el TNF- $\alpha$  es capaz de inducir una respuesta febril; ya sea por la estimulación directa del endotelio vascular del hipotálamo aumentando la producción de PGE<sub>2</sub>, como indirectamente induciendo la liberación de IL-1<sup>158</sup>. El TNF- $\alpha$  también comparte propiedades proinflamatorias con la IL-6 y la IL-11, como la capacidad para inducir la producción de reactantes de fase aguda a nivel hepático. Tanto la IL-1 como el TNF- $\alpha$  tienen también efectos proinflamatorios adicionales al estimular la producción de IL-6 en numerosas estirpes celulares. La IL-6 produce a su vez sus propios efectos y los del TNF- $\alpha$  y la IL-1, induciendo una respuesta febril sistémica y la producción de reactantes de fase aguda, perpetuando así la respuesta inflamatoria mediante una cascada de citoquinas con efectos que se superponen. El TNF- $\beta$  o linfotoxina, se produce en los linfocitos T y B activados. Sus propiedades son similares a las del TNF- $\alpha$ , aunque incluye la capacidad para inducir la apoptosis en células transformadas, infectadas viralmente o tumorales, y la estimulación de las funciones efectoras de los polimorfonucleares (PMN)<sup>159</sup>.

Los efectos de las citoquinas se ejercen de forma autocrina y paracrina en su sitio de producción, pero tanto el TNF- $\alpha$  como el TNF- $\beta$ , la IL-1 y la IL-6, tienen efectos sistémicos o endocrinos. En las sepsis por gram negativos los lipopolisacráridos bacterianos (endotoxinas) desencadenan la producción y liberación masiva de TNF- $\alpha$  por los macrófagos, y por tanto también de IL-1 e IL-6. Tanto la fiebre como la hipotensión que caracterizan al shock séptico se deben a la liberación sistémica de estas citoquinas<sup>157</sup>. De manera análoga, la producción a gran escala de TNF- $\beta$  por parte de los linfocitos T en respuesta a “superantígenos” como la toxina del shock tóxico

estafilocócico o las enterotoxinas, es responsable de las manifestaciones sistémicas de las infecciones por gram positivos productores de toxinas<sup>160,161</sup>. En caso de una producción crónica de TNF, como es en las infecciones parasitarias y algunos estados tumorales, se ha comprobado que el TNF es el responsable de las alteraciones metabólicas que producen caquexia en estos pacientes<sup>157</sup>.

#### B. Interleuquina-6.

La IL-6 tiene numerosos pseudónimos que expresan bien cuáles son sus funciones: INF- $\beta$ 2, factor de crecimiento de los plasmocitomas, factor estimulante de los hepatocitos, factor 2 estimulante de células B y factor diferenciante de células B. La IL-6 es una glicoproteína con un peso molecular que oscila entre los 21 y los 28 KDa, según su grado de modificación post-translacional. Su ADNc fue clonado en 1986 y su gen codificante se localiza en el cromosoma 7 humano<sup>162</sup>. La IL-6 se produce en los fagocitos mononucleares, las células T y los fibroblastos<sup>163,164</sup>. Estimula la producción de reactantes de fase aguda a nivel hepático, y actúa como un factor de crecimiento para las células B CD20<sup>+</sup> maduras induciendo su transformación final en células productoras de anticuerpos. La IL-6 también está involucrada en la activación y diferenciación de las células T, estimulando la producción tanto de IL-2 como la de su receptor. Uno de los efectos reguladores de la IL-6 es la inhibición de la producción del TNF, produciéndose así una autorregulación negativa para limitar la respuesta aguda. La sobreproducción de IL-6 se ha observado en algunas enfermedades inflamatorias crónicas y de origen autoinmune, como la tiroiditis, la diabetes tipo I, la artritis reumatoide, la esclerosis sistémica, la glomerulonefritis con proliferación mesangial y la psoriasis<sup>165-167</sup>. También se ha observado en algunas neoplasias como el mixoma cardíaco, el carcinoma de células renales, el mieloma múltiple, el linfoma y la leucemia<sup>165</sup>.

### ***Citoquinas implicadas en la fase crónica del rechazo.***

En el rechazo crónico las citoquinas interactúan entre sí para lograr la quimiotaxis de los monocitos al lugar donde se desarrolla la respuesta inflamatoria. Posteriormente, factores activadores de los macrófagos como el IFN- $\gamma$  o la proteína quimiotáctica de los monocitos-1 (MCP-1) se ocupan de estimular a los macrófagos, mientras que factores inhibidores de la migración celular como el factor estimulante de colonias de monocitos y macrófagos (GM-CSF) y el IFN- $\gamma$  se ocupan de retenerlos<sup>168</sup>. Los macrófagos contribuyen con la respuesta inflamatoria elaborando IL-1 y TNF a dosis bajas, que son los responsables de síntomas clínicos como la anorexia, la caquexia, la fiebre, el adormecimiento y la leucocitosis.

Las citoquinas involucradas pueden dividirse en dos grupos, según participen en la respuesta inmunitaria de tipo celular o humoral. Dentro del primer grupo se encuentran la IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12, el IFN- $\gamma$ , el TGF- $\beta$ , el TNF- $\alpha$  y el TNF- $\beta$ . Entre los factores que contribuyen a la respuesta inflamatoria crónica de tipo humoral están la IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-13 y el factor de crecimiento tumoral- $\beta$  (TGF- $\beta$ ).

#### **A Interleuquina-10.**

La IL-10 se produce en una gran variedad de células, incluyendo los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, las células T activadas CD8<sup>+</sup> y los linfocitos B activados. La IL-10 es conocida también como factor de crecimiento para células T derivado de células B y como factor inhibidor de la síntesis de citoquinas, ya que inhibe la producción del IFN-  $\gamma$  por parte de la célula T activada<sup>169</sup>. Su ADNc fue clonado en 1990 y codifica una proteína de 18 KDa.

La IL-10 reduce la proliferación de las células T antígeno específicas, disminuye la producción de IL-2 (inducida por el IFN- $\gamma$ ) por parte de las NK e inhibe la expresión del CMH tipo II (inducido por la IL-4 y el IFN- $\gamma$ ) en los monocitos<sup>170</sup>. La función “anticitoquina” de la IL-10 se debe a la regulación cruzada que ésta ejerce entre ambas estirpes de células T helper, ya que la liberación de IL-10 por parte de los helper tipo 2 inhibe la producción de citoquinas (como el IFN- $\gamma$ ) a nivel del linfocito T helper tipo 1<sup>171</sup>. La IL-10 también actúa como factor de diferenciación para los linfocitos T citotóxicos y como cofactor para el crecimiento de las células T. La IL-10 humana comparte el 84% de su estructura con su homóloga viral, codificada por el virus de Epstein-Barr. Esta IL-10 viral, al igual que la humana, inhibe la producción de citoquinas y estimula el crecimiento y diferenciación de las células B<sup>172</sup>.

### 1.3.6 Inmunosupresión: inhibidores de la calcineurina.

La experiencia clínica con los protocolos de inmunosupresión en los TTCs se ha realizado gracias al empleo de protocolos similares a los utilizados en TOS, y ha permitido lograr una supervivencia de alguno de los aloinjertos durante más de 15 años<sup>46</sup>. En la práctica clínica la medicación inmunosupresora se administra en tres fases: inmediatamente tras el alotrasplante (terapia de inducción), regular y diariamente a lo largo de toda la vida (terapia de mantenimiento), y en respuesta a los episodios de rechazo (tratamiento de rescate). A diferencia del TOS, los TTCs se caracterizan por presentar tejidos de distintas estirpes que presentan diferentes grados de antigenicidad, siendo la piel uno de los elementos más antigénicos. La presencia de ésta requiere de un mayor nivel de inmunosupresión en comparación con el necesario en un TOS<sup>173</sup>.

La medicación inmunosupresora tiene tres efectos: el efecto terapéutico (evitar los episodios de rechazo), los efectos secundarios consecuencia del estado de inmunodeficiencia (infecciones y/o cáncer) y la toxicidad no inmunitaria a otros tejidos. La inmunodeficiencia secundaria a los inmunosupresores produce infecciones y enfermedades tumorales características como los síndromes linfoproliferativos, que se asocian más a la intensidad de la inmunosupresión que al fármaco empleado<sup>174</sup>. Landín describió que la mayoría de pacientes con trasplantes de extremidad superior en el mundo ha presentado algún tipo de efecto secundario relacionado con la medicación inmunosupresora. Las complicaciones infecciosas incluyeron las micosis cutáneas, las infecciones por CMV, colitis por *Clostridium difficile*, abscesos y neumonías<sup>47,59,61,64,175-181</sup>. Entre las complicaciones metabólicas hay que destacar la diabetes mellitus insulín-dependiente, la hiperlipidemia, el aumento de la creatinina sérica, la hipertensión arterial (HTA) y un caso de necrosis bilateral de cadera<sup>46-48,65,67,175,176,182</sup>. Todas las

complicaciones fueron controladas medicamente, o mediante el ajuste a la baja de la medicación inmunosupresora<sup>55</sup>.

Los ICN son inmunosupresores derivados de productos microbianos que tienen como diana proteínas altamente conservadas a lo largo de la evolución<sup>112</sup>. Tanto la CsA como el Tac son dos fármacos que actúan inhibiendo la vía de la calcineurina e impiden la activación de los linfocitos T, actuando a nivel de la 1ª y 2ª señal del “modelo de la triple señal” (ver *Figura 1*). La diana de la CsA es la ciclofilina, mientras que la diana del Tac es la FK-BP (FK-506-binding protein). Ambos fármacos impiden la formación del complejo calcineurina-calmodulina, evitando así la fosforilación y activación del factor nuclear-AT (NF-AT)<sup>183</sup>. Esto bloquea la producción de citoquinas como la IL-2, la IL-4, el IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$ , lo que conduce finalmente a una disminución de la proliferación linfocitaria, inhibiendo la respuesta inmunitaria tipo helper 1. Aunque los estudios con células aisladas *in vitro* logran bloquear de forma completa la síntesis del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de éstas citoquinas, el bloqueo *in vivo* no es completo y los pacientes tratados con ICNs conservan cierto grado de respuesta inmunitaria. Las dosis terapéuticas empleadas y la mala biodisponibilidad del fármaco *in vivo*, sólo logran disminuir un 50% la actividad de la calcineurina, permitiendo que señales fuertes puedan activar parcialmente la respuesta inmunitaria<sup>184</sup>.

### ***Ciclosporina A.***

La CsA, sustancia sintetizada por el hongo *Tolypocladium inflatum*, fue descubierta en 1976 por Borel en el laboratorio de Sandoz® en Suiza mientras buscaba nuevos agentes antifúngicos<sup>16</sup>. Partiendo de la premisa de que la inmunidad celular estaba implicada en las reacciones de tipo autoinmune y en los procesos inflamatorios crónicos, Borel empleó antiinflamatorios, inmunosupresores y antimicóticos para examinar sus efectos sobre los linfocitos presensibilizados y los nativos. En estos experimentos demostró que la CsA inhibía tanto la lisis linfocitaria mediada por células, como la sensibilización de los linfocitos por células alogénicas *in vitro*<sup>185</sup>. Con unas tasas de episodios de RA y supervivencia de los aloinjertos a un año mucho mejores que la AZA o los corticoides, la CsA se convirtió pronto en un pilar fundamental para la inmunosupresión en los TOS<sup>186,187</sup>.

Entre 1998 y 2007 la Organización Nacional de Trasplantes de EEUU (UNOS) informó de una tasa de supervivencia al año de 96,6% y 91,6% para los pacientes trasplantados renales de donante vivo y cadáver respectivamente. Sin embargo los datos a largo plazo no fueron tan buenos, con tasas de supervivencia a los cinco años de 81,4% para los aloinjertos de donante vivo y de 71,6% para los de donante cadáver. Estas diferencias fueron atribuidas a la nefrotoxicidad de la CsA. Desde el primer momento que se empleó como inmunosupresor en humanos a dosis de 25mg/Kg, se observó una importante nefrotoxicidad que no se había descrito en los experimentos animales<sup>188</sup>. Estudios posteriores disminuyendo las dosis de CsA, así como realizando cambios en la terapia inmunosupresora a los 90 días postrasplante sustituyendo la CsA por AZA y corticoesteroides, demostraron que la nefrotoxicidad de la CsA era dosis dependiente y reversible con la discontinuidad de la medicación o la disminución de las dosis. Otros efectos secundarios de la CsA son la HTA, la hiperlipidemia, la hiperplasia



gingival, la hiperpotasemia, la hipomagnesemia, la hiperuricemia, la neurotoxicidad y la microangiopatía trombótica<sup>189</sup>. Todos ellos se deben a la inhibición de la calcineurina en tejidos no linfoides, provocando alteraciones en la función tubular y en la homeostasis de los iones<sup>190,191</sup>.

La nefrotoxicidad debida a los ICN tiene dos maneras de expresarse, la primera es una forma aguda secundaria a una disfunción vascular al estimularse la actividad de la renina plasmática<sup>192</sup>. La otra forma es crónica con un componente de fibrosis parenquimatosa, con daño túbulo-intersticial y fibrosis glomerular, que se manifiesta como una disminución del flujo glomerular, así como del flujo sanguíneo y plasmático renal<sup>193</sup>. Anatomopatológicamente la nefrotoxicidad secundaria a los ICN se caracteriza por depósitos hialinos nodulares en la túnica media de las arteriolas aferentes y fibrosis lineal en el intersticio<sup>190</sup>.

Los protocolos de retirada progresiva de los ICN, así como los protocolos sin ICN, se basan en los resultados de tres estudios realizados en pacientes sometidos a trasplante renal: los estudios ELITE-SYMPHONY y CAESAR<sup>194,195</sup>, realizados ambos en 2007, y más recientemente en 2010 el estudio BENEFIT<sup>196</sup>. Analizados conjuntamente demostraron que minimizar o evitar los ICN mantiene las mismas cifras de supervivencia tanto para el paciente como para el aloinjerto, pero que las tasas de episodios de RA eran demasiado altas (22% vs 7%) para adoptar este tipo de protocolos de manera universal. A diferencia de la nefrotoxicidad aguda por ICN, la nefropatía crónica por ICN aún no está bien documentada. El estudio DeKAF, realizado en biopsias de 173 riñones con fracaso tardío, demostró que la presencia de un rechazo humoral era algo común en las muestras y que el riesgo de pérdida del órgano trasplantado era mayor en aquellos aloinjertos con positividad para el C4d en la biopsia. De igual forma, en este estudio el diagnóstico de nefropatía crónica por ICN no afectó

de manera significativa al riesgo de pérdida del aloinjerto<sup>197</sup>. Ojo revisó la incidencia de fracaso renal crónico y sus posibles factores de riesgo en pacientes con TOS no renal. Los resultados indicaron que la edad, el sexo femenino, la hepatitis C pretrasplante, la HTA, la diabetes y el fracaso renal postrasplante eran factores de riesgo de fracaso renal crónico, pero no el uso de los ICN<sup>198</sup>.

## **1.4 RECHAZO CRÓNICO.**

### **1.4.1 Concepto.**

El rechazo crónico (RC) es una característica común a los TOS, ocurriendo normalmente a partir del primer año postrasplante y siendo la causa más prevalente de fracaso tardío del aloinjerto<sup>199</sup>. Los cambios histopatológicos que experimenta el aloinjerto han sido denominados vasculopatía fibroproliferativa, vasculopatía crónica del aloinjerto (VCA), disfunción crónica del aloinjerto o RC. La manifestación clínica más evidente del RC es la pérdida progresiva de la función del órgano trasplantado. En trasplante renal se ha visto que a los 10 años postrasplante sólo el 50% de los aloinjertos renales seguían funcionando correctamente<sup>200</sup>. En trasplante cardiaco, la VCA se puede detectar en el 43% de los receptores a los 8 años del trasplante, siendo responsable del 30% de los fallecimientos pasado el primer año post trasplante<sup>201</sup>.

En cuanto a los TTCs el RC aún no está bien definido ni comprendido. Se postula que pueda ser el resultado tanto del daño inmunitario como del no inmunitario al aloinjerto. Debido a su naturaleza tisular heterogénea se especula que probablemente los TTCs sean más vulnerables al daño producido por el RC que los TOS<sup>202</sup>.

### **1.4.2 Etiopatogenia, bases moleculares.**

Los agentes causantes de la VCA están aún por identificar. Se hipotetiza con una doble etiología, inmunitaria<sup>203</sup> y no inmunitaria<sup>204,205</sup>.

#### **1.4.2.1 Factores inmunitarios.**

Dentro de las causas de origen inmunitario los episodios repetidos de RA son posiblemente el factor más importante en la génesis del RC, al estar directamente relacionados con la respuesta celular T<sup>206-208</sup>. Otros factores inmunitarios implicados son la presensibilización del receptor, la escasa histocompatibilidad y una insuficiente inmunosupresión. En TOS las altas frecuencias de episodios de RA se asocian a una mayor incidencia de desarrollar una VCA y a una menor tasa de supervivencia de los aloinjertos. Matas estudió el impacto de la presencia de episodios de RA en la semivida ( $t_{1/2}$ ) de 653 aloinjertos renales normofuncionantes pasado el año post trasplante. Los aloinjertos que no presentaron ningún episodio de RA tuvieron una  $t_{1/2}$  de 45 +/- 11 años; los que presentaron un episodio de RA durante el primer año post trasplante una  $t_{1/2}$  de 25 +/- 8 años; los que presentaron múltiples episodios de RA, siendo el primer episodio durante el primer año una  $t_{1/2}$  de 5 +/- 11 años; y los que presentaron múltiples episodios de RA, siendo el primer episodio tras el primer año post trasplante, una  $t_{1/2}$  de 3 +/- 1 año ( $P < 0,05$ ). Entre los pacientes con episodios múltiples de RA, la principal causa de fracaso tardío del aloinjerto fue el RC y el abandono de la medicación inmunosupresora<sup>209</sup>. Akioka estudió 916 pacientes trasplantados renales, encontrando que el 58,1% (532 pacientes) presentó episodios de RA. La supervivencia de los aloinjertos renales a los 5 y 10 años postrasplante fue de 80,2% y 70,6% respectivamente en el grupo de pacientes que no experimentó ningún episodio de RA, frente al 75,2% y 55,2% respectivamente en el grupo que si presentó episodios de RA,

siendo peor la supervivencia en los pacientes que presentaron episodios tardíos de RA y episodios múltiples de rechazo ( $P < 0,00006$ )<sup>210</sup>.

#### A Modelos experimentales de inmunosupresión subóptima.

Unadkat desarrolló un modelo de trasplante de extremidad posterior en rata a dosis infraterapéuticas de inmunosupresión para provocar una VCA mediante episodios múltiples de RA. Los grupos del estudio incluían animales con inmunosupresión de mantenimiento a dosis normales (CsA 10mg/Kg/día), animales con terapia de mantenimiento a dosis bajas (CsA 5mg/Kg/día) y animales sin tratamiento inmunosupresor, pero que ante la evidencia de signos clínicos de rechazo en la pata se realizaba tratamiento de rescate con CsA 10mg/Kg/día y dexametasona 2mg/Kg/día. En su modelo los grupos con múltiples episodios de RA desarrollaron una VCA, siendo el más significativo el del grupo sin inmunosupresión sometido a múltiples rescates. Las dosis infraterapéuticas de medicación inmunosupresora evitaron el desarrollo de episodios de RA severo, pero permitieron que se desarrollase la VCA<sup>203</sup>.

Schneeberger trabajó sobre trasplante cardiaco en ratas, donde los animales sólo recibían tratamiento inmunosupresor con CsA 5mg/Kg/día durante los primeros 10 días PO, dejando posteriormente a los animales sin terapia de mantenimiento. Con esta pauta evitaban el desarrollo de episodios de RA tempranos, pero se evidenciaba el desarrollo de la VCA en los primeros 60 días PO<sup>211</sup>.

En un trabajo de Wang sobre el empleo de pulsos de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) en trasplante cardiaco, también se empleó un modelo de inmunosupresión subóptima para lograr el desarrollo de la vasculopatía. La inducción se realizó mediante la administración preoperatoria de globulinas antilinfocíticas, empleando anti-CD4 y

anti-CD8 de ratón los días 6, 3 y 1 antes del trasplante, pero sin terapia de mantenimiento posterior<sup>204</sup>.

Syrjälä empleó un modelo de inmunosupresión subóptima en un trabajo de trasplante cardíaco en rata. En este estudio los aloinjertos se sometieron a 4 horas de preservación en frío para estudiar el desarrollo de la VCA, y posteriormente se recuperaban a las 6 horas, a las 24 horas, a los 10 días y a las 8 semanas. Los animales trasplantados recibieron durante la primera semana PO CsA a 2mg/Kg/día, y posteriormente como terapia de mantenimiento CsA a dosis de 1mg/Kg/día<sup>212</sup>. Con su trabajo demostró que la preservación en isquemia fría activaba al sistema inmunitario innato, y que modulado por el sistema inmunitario adaptativo se producía una obliteración de las arterias coronarias y a una fibrosis de los aloinjertos cardíacos. También se sugirió que la CsA no era capaz de suprimir este tipo de respuesta inmunitaria.

#### **1.4.2.2 Factores no inmunitarios**

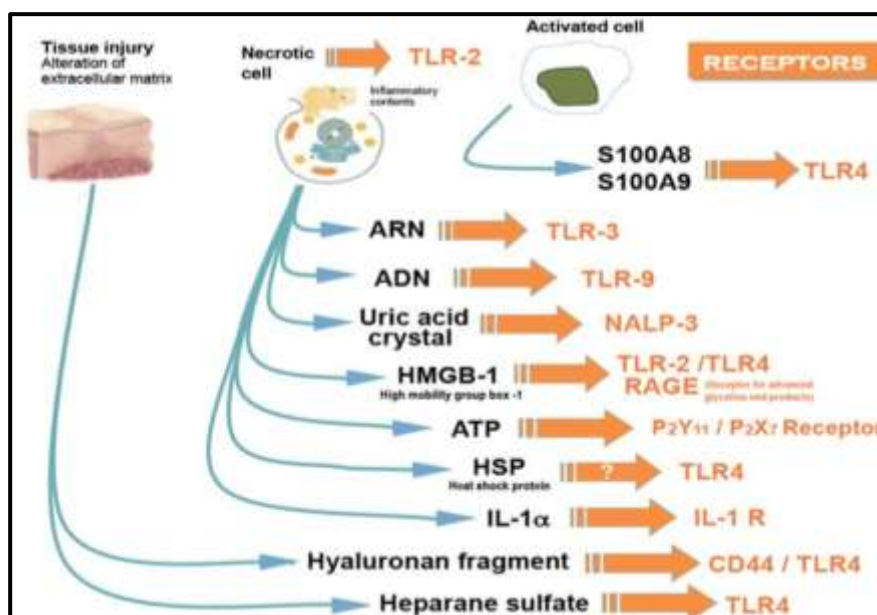
Los factores no inmunitarios actúan como elementos agravantes del rechazo, aumentando la intensidad del mismo y perpetuando la respuesta inmunitaria. Dentro de los posibles factores no inmunitarios se encuentran el tiempo de isquemia pretrasplante, el daño por isquemia reperfusión (DIR), la edad y raza del donante, la HTA, la hiperlipidemia (hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia), el tabaco, las infecciones/reactivaciones del CMV y la hipotermia<sup>210</sup>. Todos estos factores no inmunitarios pueden actuar de manera indirecta o directa. Actúan modulando la respuesta inmunitaria; aumentando la antigenicidad de los aloinjertos con una regulación al alza de los antígenos en forma de CMH, y activando la cascada de citoquinas proinflamatorias para una sobreexpresión de moléculas de adhesión<sup>213,214</sup>.

También directamente, actúan dañando el endotelio vascular y activando el sistema inmunitario innato de una manera no específica a través de la interacción de los receptores de reconocimiento de patrones (RRP) con los patrones moleculares asociados al daño (PMAD).

Las células del sistema inmunitario innato (células NK, mastocitos, basófilos, eosinófilos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas...) expresan unas proteínas de membrana conocidas como RRP, que son empleados para identificar moléculas asociadas con patógenos microbianos o con estrés celular<sup>215</sup>. Los RRP incluyen proteínas transmembrana y citosólicas como los receptores tipo Toll (RTT), los receptores tipo NOD, los receptores para productos finales de la glicosilación avanzada (RAGE) o los receptores tipo RIG-I<sup>216</sup>. Las moléculas microbianas que un RRP es capaz de reconocer se denominan patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP), e incluye moléculas de carbohidratos bacterianos como los lipopolisacáridos o la manosa, el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN) bacteriano o viral, peptidoglicanos de bacterias gram positivas, formilmetionina y lipoproteínas. Las señales de estrés celular que reconocen los RRP se denominan PMAD.

Los PMAD incluyen proteínas intracelulares nucleares y citosólicas, que al liberarse al medio extracelular o exponerse en la membrana como consecuencia del daño celular pasan de un medio reductor a uno oxidante y se desnaturalizan convirtiéndose en PMADs<sup>217</sup>. Un ejemplo serían los metabolitos de la purina: ácido úrico, nucleótidos como el adenosín trifosfato (ATP) o nucleósidos como la adenosina<sup>218</sup>. Igualmente, cuando el ADN o el ARN nuclear se detectan extracelularmente como consecuencia de la necrosis celular, éstos se comportan como PMAD<sup>219</sup>. Los PMAD incluyen también moléculas secretadas por las propias células en el momento de su muerte, proteínas secretadas sin líder (PSL), como son la IL-1 $\alpha$ , la IL-18, la proteína del grupo de alta

movilidad 1 asociada a la cromatina (HMGB1) o las proteínas S100 (el subgrupo más grande dentro de la subfamilia de proteínas transportadoras de  $\text{Ca}^{2+}$  con dominio estructural tipo “mano EF” o tipo hélice-bucle-hélice); <sup>220,221</sup>. Por último, los PMAD también incluyen elementos degradados de la matriz extracelular como son los fragmentos del ácido hialurónico o el heparán sulfato<sup>222</sup>. Un resumen de los PMAD más frecuentes, su origen y su RRP asociados se encuentra en la *Figura 4*.



**Figura 4. PMADs, origen y RRP asociados.** Tissue injury, alteration of extracellular matrix: daño tisular, alteración de la matriz extracelular; necrotic cell: célula necrótica; inflammatory contents: contenidos proinflamatorios; TLR: receptor tipo Toll; activated cell: célula activada; receptors: receptores; uric acid crystal: cristal de ácido úrico; HSP: proteína de choque térmico; hyaluronan fragment: fragmento de hialurónico; heparane sulfate; heparán sulfato.

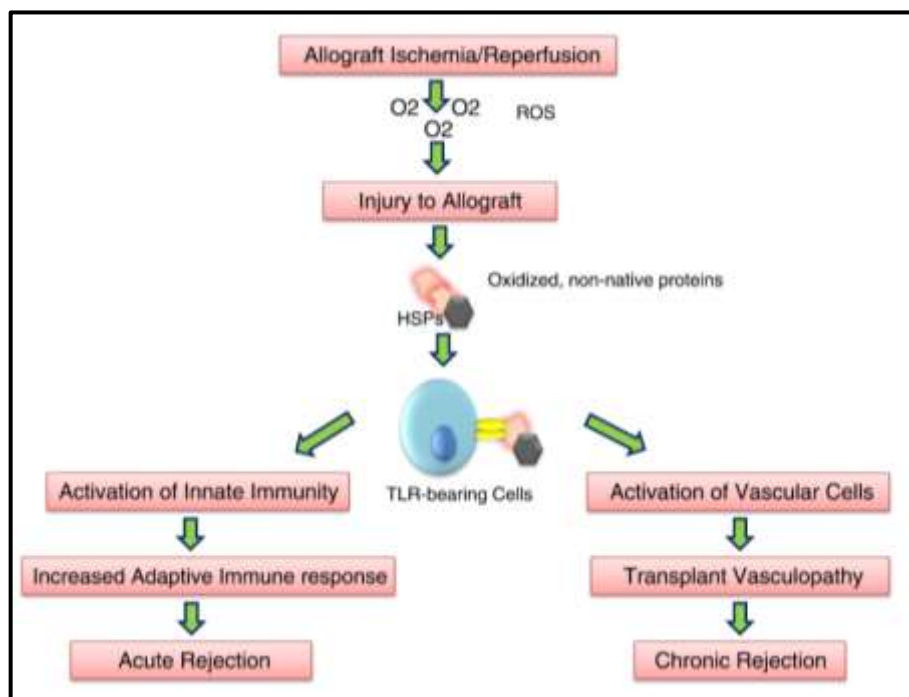


El resultado final de la activación de los RRP's por parte de los PMADs se explica por el modelo publicado por Land en 1994: “la hipótesis del daño” (ver *Figura 5*)<sup>223</sup>. Según éste, los radicales libres de oxígeno (RLO) formados durante el proceso de reperfusión del órgano trasplantado dañan tanto las proteínas del receptor como las del donante, produciendo la aparición de proteínas desnaturalizadas tanto intra como extracelularmente. La presencia de estas moléculas a nivel intracelular producirá la activación de las proteínas de choque térmico (HSP), que debido a su actividad como citoquinas (o chaperoquinas) activarán al RTT<sup>224</sup>. Como los RTTs se expresan en la mayor parte de las células efectoras del sistema inmunitario innato (células NK, macrófagos y neutrófilos), su activación producirá una respuesta inmunitaria no específica. Tanto la activación de los macrófagos como la de las células NK se han visto directamente relacionadas con los episodios de RA y RC<sup>225,226</sup>. Methe demostró que en pacientes trasplantados cardiacos con signos de VCA, los niveles de ARNm del RTT-4 en las células del endotelio vascular así como la expresión de RTT-4 en la superficie celular se encontraban elevados de manera significativa ( $P < 0,05$  y  $P < 0,005$  respectivamente). Estos hallazgos sugieren que la activación del sistema inmunitario innato a través del RTT-4 en pacientes con trasplante cardiaco contribuye al desarrollo de la VCA<sup>227</sup>.

#### A *Daño por isquemia reperfusión.*

Según el modelo de Land “la hipótesis del daño” anteriormente descrito (ver *Figura 5*), el DIR es uno de los factores no inmunitarios más directamente implicados en el desarrollo de la VCA. Posiblemente el DIR sea el factor no inmunitario que de forma más intensa aumenta el grado de antigenicidad del aloinjerto<sup>228</sup>. La hipótesis de que el DIR actúa como un importante factor de riesgo, tanto para los episodios de RA como para el desarrollo de la VCA a largo plazo, ha sido estudiada con profundidad en

TOS<sup>229</sup>. En un estudio de Tullius sobre trasplante renal en ratas sometiendo los aloinjertos a tiempos de isquemia progresivamente más largos (5, 60 y 120 minutos), se encontró de manera significativa un aumento de los episodios de RA y del infiltrado linfocitario (CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>) con el aumento progresivo de los tiempos de isquemia<sup>230</sup>. En trasplante cardiaco se ha demostrado de manera estadísticamente significativa que los tiempos de isquemia prolongados favorecen el desarrollo de la VCA y aumentan la tasa de mortalidad al año y a los 10 años postoperatorios<sup>231</sup>. Pradka estudió la influencia de los tiempos de isquemia sobre los signos de RA en colgajos epigástricos alogénicos de rata, encontrando diferencias significativas en el grado de rechazo cuando el tiempo de isquemia aumentaba de una hora a tres<sup>232</sup>.



**Figura 5. “La hipótesis del daño”.** Allograft ischemia/reperfusion: aloinjerto isquemia/reperfusión; ROS: radicales libres de oxígeno; injury to allograft: daño al aloinjerto; oxidized, non-native proteins: proteínas no nativas oxidadas; HSP: proteína de choque térmico; TLR-bearing cells: células portadoras de RTT; activation of innate immunity: activación del sistema inmunitario innato; activation of vascular cells: activación de las células vasculares; increased adaptative immune response: respuesta inmunitaria adaptativa incrementada; transplant vasculopathy; vasculopatía del trasplante; acute rejection: rechazo agudo; chronic rejection: rechazo crónico (Reproducido con permiso: Land WG. The role of postischemic reperfusion injury and other nonantigen-dependent inflammatory pathways in transplantation. Transplantation. 2005;79(5):505-14. Epub 2005/03/09. Copyright Wolters Kluwer).

**B Edad, sexo y raza.**

Chertow analizó los datos de 31.000 trasplantados renales entre 1987 y 1992, para evaluar posibles factores de riesgo no inmunitarios implicados en la supervivencia a largo plazo de los aloinjertos. Los factores más importantes para un fracaso tardío del órgano fueron los aloinjertos procedentes de donantes femeninas y/o de donantes afroamericanos. Los riñones procedentes de donantes en edades extremas también presentaron un peor pronóstico a largo plazo<sup>233</sup>. El estudio de Tullius sobre trasplante renal en ratas detectó que el deterioro funcional e histológico de los aloinjertos era proporcional a la edad de las ratas donantes (3, 12 y 18 meses). También observó que el DIR era mayor en los aloinjertos procedentes de las ratas de mayor edad, que tiempos de isquemia muy cortos eran especialmente lesivos para esos aloinjertos, y que ambos factores actuaban de manera sinérgica<sup>230</sup>.

**C Hipertensión arterial.**

La HTA es una de las complicaciones más frecuentes tras un trasplante renal, requiriendo tratamiento antihipertensivo entre el 70 y el 90% de los pacientes trasplantados<sup>234</sup>. La HTA descontrolada produce una disminución del filtrado glomerular, insuficiencia cardíaca congestiva y VCA coronaria<sup>235</sup>. Hillebrad demostró en una revisión de 505 trasplantes renales, que el control de la HTA está directamente relacionado con la supervivencia del aloinjerto a largo plazo ( $P < 0,001$ )<sup>236</sup>. Khalkhali realizó un estudio retrospectivo con 1534 pacientes trasplantados renales para valorar la relación entre los factores de riesgo no inmunitarios y la nefropatía crónica del aloinjerto. En su muestra hubo un total de 214 pacientes afectados, y la HTA se comportó como un factor de riesgo para el desarrollo de la VCA a nivel renal pasado el primer año post trasplante, con un riesgo relativo (RR) de 3,126 ( $P = 0,001$ )<sup>237</sup>.

#### **D Hiperlipidemia.**

La hiperlipidemia se observa con frecuencia tras un trasplante cardiaco, y se asocia generalmente al tratamiento inmunosupresor empleado en estos pacientes<sup>238</sup>. Tanto la prednisona como la CsA se han asociado de manera significativa ( $P = 0,001$  y  $P = 0,02$  respectivamente) con un aumento de los niveles de LDL colesterol<sup>239</sup>. La prevalencia de hiperlipidemia en los pacientes receptores de un trasplante cardiaco es alta, llegando al 60 – 80%<sup>240</sup>. A pesar de las recomendaciones dietéticas, el 66% de los pacientes presentan unos niveles de LDL colesterol por encima de los 130 mg/dL, y el 41% tienen los triglicéridos por encima de los 200 mg/dL a los 6 meses del trasplante<sup>240</sup>.

El RTT-4 está presente en las células del endotelio vascular, así como en las células presentes en las placas de aterosclerosis. El RTT-4 se activa por ligandos endógenos proaterogénicos como la fibronectina presente en la neo-íntima de las placas de ateroma o los lípidos oxidados de la misma. La activación del RTT-4 activa al sistema inmunitario innato, colaborando en la patogénesis de la VCA y en la desestabilización de la propia placa<sup>241</sup>. En un estudio retrospectivo realizado por Eich con 38 pacientes trasplantados cardiacos con más de tres años de supervivencia, se demostró que la hipercolesterolemia a partir del sexto mes post trasplante se comporta como un factor de riesgo para el desarrollo de VCA coronaria y fracaso cardiaco a partir de los tres años de la intervención ( $P < 0,01$ )<sup>242</sup>. Escobar estudió 101 pacientes trasplantados cardiacos de forma prospectiva y demostró que los niveles de colesterol total, los de LDL colesterol y los de triglicéridos se comportan como factores de riesgo independientes para la presencia y grado de severidad de la VCA en los aloinjertos cardiacos, detectada por BMU<sup>243</sup>.

**E Infecciones/reactivaciones del citomegalovirus.**

En pacientes trasplantados cardíacos la seropositividad y las infecciones por CMV se han asociado a una mayor incidencia de VCA<sup>238</sup>. El endotelio vascular es una diana habitual de las infecciones por CMV, estimulando la liberación de factores de crecimiento y citoquinas que crean un entorno proinflamatorio alrededor de las células infectadas. Los linfocitos T citotóxicos, al igual que las células NK, destruirán directamente a las células endoteliales infectadas<sup>244,245</sup>. También hay que señalar que el CMV es capaz de codificar una proteína con una secuencia homóloga y con reactividad cruzada al HLA-DR, estimulando así las respuestas inmunitarias contra las células infectadas<sup>246</sup>. Fateh-Moghadam en un estudio con 103 pacientes trasplantados cardíacos, encontró que la positividad para CMV se asociaba de manera significativa a lesiones de VCA de mayor tamaño y con una mayor progresión ( $P = 0,02$  y  $P = 0,002$  respectivamente). También demostró que la positividad para CMV se comportaba como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de la VCA en aloinjertos cardíacos ( $P = 0,038$ ), y que éstos pacientes también tenían una mayor probabilidad de presentar una VCA de progresión rápida ( $P = 0,017$ )<sup>247</sup>. En humanos, la profilaxis postoperatoria con Ganciclovir se ha asociado a una menor probabilidad de desarrollar una VCA a nivel coronario<sup>244</sup>.

## **F Hipotermia.**

Los TOS se pueden realizar con un donante vivo o con un donante cadáver, que a su vez puede estar en muerte cerebral con corazón latiente o tras parada cardíaca<sup>248</sup>. Los trasplantes renales realizados de donante vivo consanguíneo tienen un mejor comportamiento global que los realizados con aloinjertos de donante cadáver. La histocompatibilidad explica la menor respuesta inmunitaria observada en estos pacientes, presentando una supervivencia a uno, cinco y diez años (91%, 75% y 60% respectivamente) superior que los riñones de donante cadáver (81%, 58% y 39% respectivamente) de forma significativa ( $P = 0,001$ )<sup>249</sup>. Sin embargo, los resultados de supervivencia a largo plazo de los aloinjertos renales de donantes vivos no consanguíneos son virtualmente idénticos a los de donantes compartiendo al menos un haplotipo (81% a los tres años), y mucho mejores que los aloinjertos de donante cadáver no consanguíneo (70% a los tres años)<sup>250</sup>. Esto sugiere la implicación de una serie de factores no inmunitarios, al margen de los factores genéticos, que están en relación con el estado del donante. La muerte cerebral provoca una alteración en los niveles de las catecolaminas circulantes que lleva a una hipotensión generalizada y una hipoperfusión de los órganos, que posteriormente se acentuará con la respuesta inflamatoria sistémica producida por moléculas como la IL-1, la IL-6 y la IL-8. El daño por esta hipoperfusión es previo a la reperfusión del órgano y el DIR, y explica la menor supervivencia de los riñones de donante cadáver frente a los de donante vivo<sup>251</sup>.

En el TOS de donante cadáver, mantener la viabilidad durante el transporte del órgano hasta su trasplante en hospital del receptor (fase de preservación) es fundamental para un buen resultado. El fundamento de la preservación de órganos en hipotermia se basa en que a 4°C se suprime el metabolismo y las enzimas catabólicas. Southard describió la reducción a la mitad de la actividad metabólica por cada 10°C de

disminución en la temperatura, ya que las enzimas de los animales normotérmicos reducen su actividad de 1,5 a 2 veces por cada 10°C de descenso de temperatura, quedando el metabolismo reducido a un 10% - 12% del original a 4°C<sup>252</sup>. Los órganos expuestos a isquemia normotérmica generalmente sólo permanecen viables durante menos de 1 hora, sin embargo, enfriando de 37°C a 4°C se puede alargar el tiempo de preservación hasta 12-13 horas<sup>253</sup>. La hipotermia disminuye los requerimientos de oxígeno y enlentece la actividad enzimática, llegando casi a paralizarla en valores por debajo de los 0°C. Debido a la formación de cristales de hielo intracelulares que provocan la destrucción de la membrana celular, la congelación no es un método de preservación válido<sup>254</sup>.

Hay dos maneras de preservar el órgano: preservación fría estática y preservación mecánica en hipotermia por perfusión, siendo la primera la más frecuente<sup>252</sup>. La preservación fría estática comienza con un lavado intravascular de arrastre del órgano a trasplantar con una solución de preservación fría, para eliminar los restos hemáticos (elementos formes, isoaglutininas y factores de la coagulación), producir un enfriamiento inicial y equilibrar la solución de preservación en los tejidos. A continuación se coloca el órgano en un compartimento estanco sumergido en solución de preservación fría, y éste compartimento se rodea a su vez de hielo para mantener la hipotermia durante el transporte del órgano<sup>255</sup>. Las soluciones de preservación intentan contrarrestar los efectos deletéreos de la isquemia: edema celular, expansión del espacio intersticial, acidosis, entrada de calcio al medio intracelular y producción de RLO. La solución de preservación más empleada en Europa para la preservación de órganos abdominales es la solución de la Universidad de Wisconsin (SUW), aunque también existe la solución HTK (histidina-triptófano-ketoglutarato) y la solución Celsior (ambas más empleadas en trasplante cardíaco)<sup>256</sup>. Los componentes de la SUW son el

lactobionato y la rafinosa como agentes osmóticos; el hidroxietilalmidón como coloide; el glutatión y el alopurinol como sustancias barrendero (scavengers); sodio (Na), potasio (K) y magnesio (Mg) como electrolitos; fosfato y sulfato como tampones; ATP, dexametasona e insulina<sup>257</sup>. En los TTCs clínicos se utiliza la preservación estática en frío del aloinjerto con el objetivo de evitar el daño que la isquemia a temperatura ambiente causa en los tejidos.

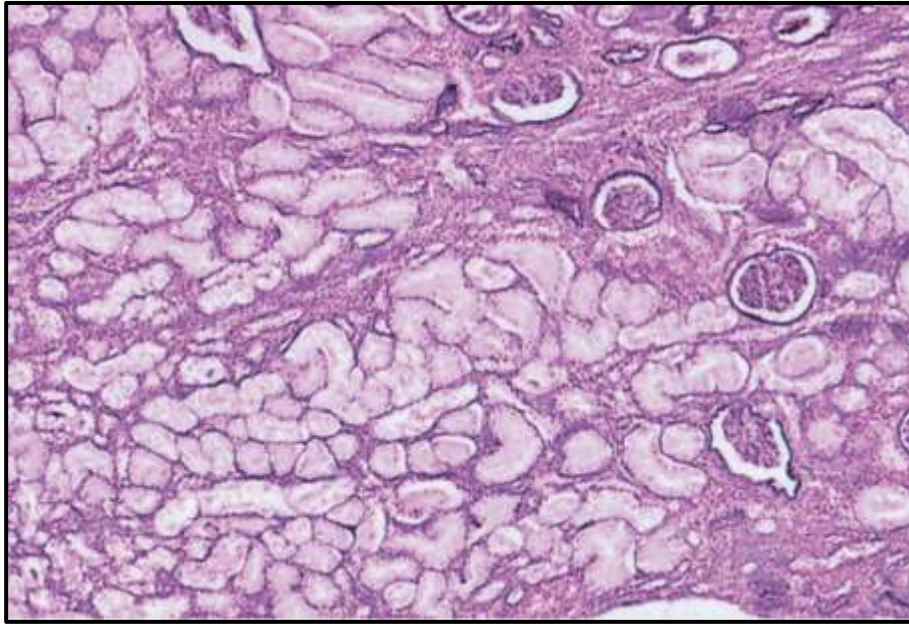
A pesar de todo esto la hipotermia no está exenta de efectos adversos ni protege completamente de los efectos deletéreos de la isquemia<sup>258-261</sup>. Su capacidad para disminuir la actividad metabólica y el consumo del ATP, supone que también disminuye la actividad de la enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa, lo que produce edema celular<sup>252</sup>. La isquemia fría también produce un daño mitocondrial heterogéneo que conduce a una disminución de la actividad contráctil en los aloinjertos cardiacos: desacopla la fosforilación oxidativa del citocromo C, crea defectos específicos en el complejo I de la cadena respiratoria, disminuye la actividad funcional mitocondrial y produce una ruptura de la membrana mitocondrial con liberación del citocromo C al citoplasma (deteniendo los complejos respiratorios mitocondriales II y IV)<sup>262-264</sup>. Knight demostró en un modelo experimental de trasplante cardiaco en ratas, que la preservación en isquemia fría aceleraba el desarrollo de la VCA a los 90 DPO de manera significativa ( $P < 0,05$ )<sup>265</sup>. Tanaka describió en un modelo experimental en ratas que el grado de apoptosis de los cardiomiocitos y la respuesta inflamatoria de los aloinjertos cardiacos está directamente relacionada con el tiempo de isquemia fría. También demostró que la preservación en frío es un factor directamente implicado en el desarrollo de la VCA de manera lineal; alcanzándose un pico en los valores de oclusión de la luz arterial, en el porcentaje de vasos enfermos por campo y en la relación íntima/media a los 120 minutos de isquemia fría, que posteriormente se hacía una meseta a partir de los 150



minutos de preservación<sup>266</sup>. Los resultados de un estudio experimental de trasplante renal en ratas de Herrera-Fresnedo, demostraron que la isquemia fría y la alorreactividad aumentan la mortalidad inmediata post trasplante y la mortalidad a los 3 meses PO, así como la respuesta inflamatoria y el infiltrado celular, colaborando así en la remodelación patológica de los vasos del aloinjerto y la inducción del RC<sup>267</sup>. En modelos experimentales de trasplante cardiaco, Schneeberger también ha comprobado que la isquemia fría, al igual que los episodios de RA, tiene un impacto en la función mitocondrial, la función cardiaca y la progresión del RC, dato que también se había presentado en trabajos de Kuznetsov, See o Duboc<sup>211,268-270</sup>.

### 1.4.3 Histopatología del rechazo crónico.

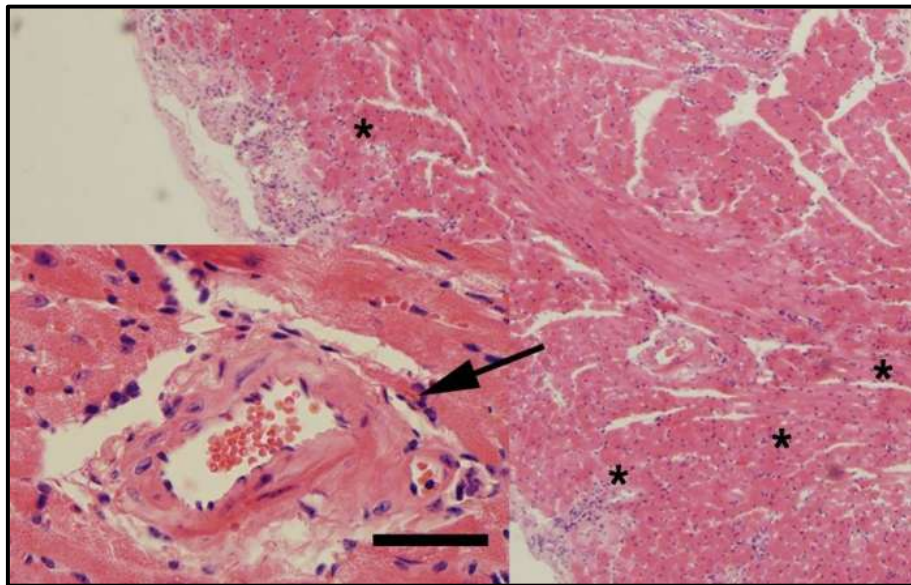
La histopatología de la nefropatía crónica del aloinjerto renal es inespecífica. Incluye la presencia de aterosclerosis, lesiones a nivel glomerular, membranas basales multilaminares en los capilares peritubulares, glomeruloesclerosis, fibrosis intersticial y atrofia tubular (ver *Figura 6*). La aterosclerosis aparece como un engrosamiento concéntrico de la íntima que afecta a gran parte de las arterias y arteriolas renales, normalmente acompañado de un infiltrado macrofágico y linfocítico de la pared vascular de grado moderado. Las lesiones glomerulares son variables, pudiéndose presentar desde un colapso del ovillo glomerular, a hipertrofia del glomérulo, expansión de la matriz mesangial y/o glomeruloesclerosis focal<sup>271,272</sup>. En estudios con microscopía electrónica se ha detectado la presencia de membranas basales multilaminares de forma concéntrica en los capilares peritubulares en el 80% de los aloinjertos renales estudiados con RC<sup>273</sup>. Aunque esta lesión no se considera específica *per se*, la presencia de más de 7 capas en la membrana basal está presente en el 38% de las nefropatías crónicas del aloinjerto y se considera específica de ésta<sup>274</sup>. La fibrosis intersticial presenta los mismos componentes moleculares que otros tipos de nefropatía como la lúpica, la diabética o los episodios de RA. Sus componentes son los mismos que los de la membrana basal (colágeno tipo IV, laminina y heparán sulfato) a los que se añaden la decorina y el colágeno tipo III<sup>275</sup>. La clasificación Banff para la nefropatía crónica del aloinjerto renal incluye en la gradación de la severidad de la lesión tanto la fibrosis intersticial como la atrofia tubular, y más recientemente los cambios crónicos a nivel glomerular y vascular<sup>276</sup>.



**Figura 6. Nefropatía crónica en aloinjerto renal de rata (×100), tinción de PAS.** En la imagen se aprecia la fibrosis intersticial y la atrofia tubular (Reproducido con permiso: Herrero-Fresneda I, Torras J, Cruzado JM, Condom E, Vidal A, Riera M, et al. Do alloreactivity and prolonged cold ischemia cause different elementary lesions in chronic allograft nephropathy? *Am J Pathol.* 2003;162(1):127-37. Epub 2003/01/01. Copyright Elsevier).

La VCA en trasplante cardiaco se caracteriza por un engrosamiento difuso y concéntrico de la íntima de las arterias coronarias epicárdicas e intramurales, afectándolas en toda su longitud desde la base del corazón hasta el ápex. Estas características permiten diferenciarla de la aterosclerosis común, que típicamente presenta unas lesiones focales de crecimiento excéntrico a nivel proximal de las arterias coronarias pericárdicas. En la VCA pueden estar afectas tanto las arterias como las venas coronarias<sup>277</sup>. Los aloinjertos cardiacos con RC también presentan infiltrados macrofágicos, linfocitarios y de células musculares lisas a nivel de la íntima y la adventicia vascular, así como un aumento de los depósitos de la matriz extracelular (ver *Figura 7*)<sup>278</sup>. La lesión característica de la VCA a nivel coronario es histopatológicamente indistinguible de las placas de aterosclerosis, ya que en ambas lesiones hay una proliferación de células musculares lisas y un acúmulo de lípidos a

nivel extracelular<sup>279</sup>. Sin embargo, en la aterosclerosis se tiende a producir un acúmulo de calcio y una ruptura de la lámina elástica interna, algo que raramente ocurre en las lesiones de la VCA. Igualmente la ruptura de la placa de aterosclerosis y la formación de una placa complicada (hemorragia, agregación plaquetaria y trombo) tampoco se observa en la vasculopatía del aloinjerto<sup>280</sup>. Finalmente, otra diferencia importante es que en la VCA los cambios histopatológicos son muy rápidos, con una progresión acelerada en comparación con la aterosclerosis común. Las lesiones de la VCA aparecen de forma temprana al cabo de 1 o 2 semanas del trasplante cardíaco, y con la aparición de células espumosas a los pocos meses<sup>281</sup>.



**Figura 7. Vasculopatía crónica en aloinjerto cardíaco de ratón (×40), tinción de H-E, con detalle de la afectación coronaria intramural (×400).** La flecha marca la hiperplasia de la íntima y los asteriscos el infiltrado leucocitario (Reproducido bajo Creative Commons Attribution license: Huang X, Ren L, Ye P, Cheng C, Wu J, Wang S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma deficiency in T cells accelerates chronic rejection by influencing the differentiation of CD4+ T cells and alternatively activated macrophages. PLoS One. 2014;9(11):e112953. Epub 2014/11/11).

En los foros iniciales sobre trasplante de mano, se especuló con que el RC se manifestaría como una intensa fibrosis de la dermis o con cambios disqueratósicos en el aloinjerto<sup>282,283</sup>. Se llegó incluso a sugerir que se tratase a los primeros pacientes trasplantados de manos como un modelo incipiente de esclerodermia<sup>284</sup>, ya que se creía que las dianas del RC eran la piel y los anejos cutáneos, a semejanza de la enfermedad de injerto contra huésped crónica de los pacientes trasplantados de médula ósea<sup>285,286</sup>. Actualmente sabemos que la característica histopatológica que define al RC en los TTCs es el daño al endotelio vascular.

La organización básica de la pared de todas las arterias es similar en cuanto a que se pueden distinguir tres capas concéntricas, afectadas todas por la VCA. Una capa interna, la túnica íntima, que consiste en un tubo endotelial monocapa sobre una fina capa de matriz extracelular, con alguna célula muscular aislada y cuyas células endoteliales tienen su eje mayor orientado longitudinalmente. Una capa intermedia, la túnica media, mucho más gruesa que la íntima y compuesta por numerosas capas de leiomiocitos dispuestos circularmente y embebidos en una rica matriz extracelular de colágeno y elastina. Una capa externa, la túnica adventicia, constituida por fibroblastos y fibras colágenas orientadas en su mayor parte longitudinalmente, así como ramas terminales del sistema nervioso autónomo y escasos leucocitos y matriz extracelular. Esta capa externa se funde gradualmente con el tejido conectivo laxo alrededor de los vasos. El límite entre la túnica íntima y la túnica media está marcado por la lámina elástica interna, la cual está especialmente bien desarrollada en las arterias de mediano calibre. Entre la túnica media y la túnica adventicia se puede distinguir una lámina elástica externa más fina (ver *Figura 8*).

Desde las arterias de mayor calibre hasta los capilares, existe una continua gradación en cuanto al diámetro y a las características de la pared vascular. Las arterias se clasifican según su tamaño, el componente predominante de su túnica media y su función principal en elásticas, musculares y arteriolas. Las arterias elásticas son los grandes vasos conductores, tales como la pulmonar, aorta, braquiocefálica, subclavia, carótida común e iliaca común. Al ir disminuyendo gradualmente el diámetro y espesor de la pared, van dando ramas laterales en que las paredes contienen menos fibras elásticas y más músculo liso. Las arterias musculares o de distribución incluyen las arterias braquiales, femorales, radiales, poplíteas y sus ramas. Éstas tienen una íntima más fina que las arterias elásticas, pero una organización similar. Periféricamente a la íntima en los cortes transversales, existe una elástica interna bien desarrollada que normalmente tiene un contorno ondulado debido a la contracción de la media del vaso. El grosor de la media oscila de tres a cuatro capas de células musculares lisas en las pequeñas arterias hasta 40 capas celulares en las de mayor diámetro, dispuestas de forma circunferencial, muy unidas y en paquetes paralelos. La media también contiene fibras elásticas de orientación predominantemente circunferencial, que en las preparaciones con fucsina-resorcina aparecen en forma de líneas onduladas oscuras entre los leiomiocitos. En los cortes histológicos, la elástica externa suele aparecer como una lámina continua en el límite entre la media y la adventicia. La adventicia de las arterias musculares suele ser más gruesa que la media. Está constituida por fibroblastos, fibras elásticas y colágenas orientadas principalmente de forma longitudinal. Se continúa con un tejido conectivo subyacente sin un límite claramente definido (ver *Figura 8*)<sup>287</sup>.

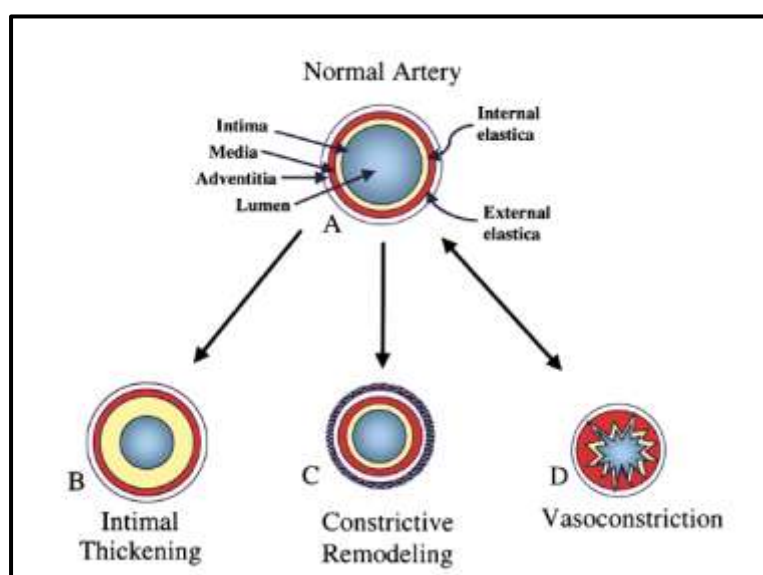




**Figura 8.** Preparación histológica de arteria femoral sana de rata ( $\times 200$ ), tinción de H-E.

Los fracasos tardíos debidos a una VCA presentan una estenosis progresiva de la luz vascular en el aloinjerto, cuyo mecanismo fundamental es un engrosamiento difuso y concéntrico de la íntima (hiperplasia intimal)<sup>288</sup>. Este fenómeno se debe a la migración de las células musculares lisas de la media hacia la íntima, así como a la producción de una mayor matriz extracelular a ese nivel. El reclutamiento de leucocitos como respuesta al DIR y al proceso inflamatorio del RA también contribuye al engrosamiento de la íntima (ver *Figura 9B*)<sup>289</sup>. Adicionalmente se produce una constricción vascular secundaria a una fibrosis cicatricial de la adventicia, que comprime el vaso de manera extrínseca (remodelación constrictiva o negativa, ver *Figura 9C*)<sup>290,291</sup>. Además de estas dos formas estáticas de reducción de la luz vascular, en el RC también se producen fenómenos dinámicos de vasoconstricción debido a la alteración del equilibrio de las fuerzas de vasodilatación-vasoconstricción. En condiciones normales los leiomiocitos

de la túnica media están sometidos al estímulo vasodilatador endógeno del NO producido por las células endoteliales sanas. Durante los episodios de RA se produce un daño endotelial que elimina este tono vasodilatador endógeno, produciéndose un estado de vasoconstricción dinámica reversible, que se puede corregir empleando fármacos vasodilatadores o cuando se recupera la función vasodilatadora endotelial de forma fisiológica (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.D**). Hay que tener en cuenta que debido a este daño endotelial, durante los episodios de rechazo los pacientes pueden presentar respuestas vasculares anómalas cuando se administran fármacos vasodilatadores con acción a nivel endotelial<sup>292</sup>. En la VCA se combinan este estado dinámico de vasoconstricción reversible con los mecanismos irreversibles de disminución de la luz arterial a nivel estructural (hiperplasia de la íntima y remodelación constrictiva), asociados a la aparición de folículos linfoides terciarios que se desarrollan incluso en ausencia de signos cutáneos de RA<sup>35,158,293</sup>. La progresiva estenosis vascular produce isquemia en el aloinjerto, lo que en TOS conduce a una fibrosis irreversible del parénquima del órgano trasplantado y al deterioro funcional del mismo<sup>108,294</sup>.



**Figura 9. Remodelación arterial en la VCA.** Normal artery: arteria sana; intimal thickening: engrosamiento de la íntima; constrictive remodeling: remodelación constrictiva o negativa; vasoconstriction: vasoconstricción. (Reproducido con permiso: Libby P, Pober JS. Chronic rejection. *Immunity*. 2001;14(4):387-97. Epub 2001/05/05. Copyright Elsevier).



#### 1.4.4 Diagnóstico.

La nefropatía crónica del aloinjerto renal se caracteriza por una pérdida lenta pero progresiva de la función renal pasados los tres meses post trasplante, asociándose muchas veces la presencia de proteinuria y el empeoramiento, o aparición *de novo*, de HTA<sup>295</sup>. Del 20 al 28% de los pacientes con nefropatía crónica del aloinjerto tienen más de 0,5g de proteinuria / 24 horas, en comparación con el 6 – 8% de los pacientes trasplantados que la presentan sin padecer un RC<sup>296</sup>. Lamentablemente el valor diagnóstico de la HTA post trasplante es muy limitado, dada la alta prevalencia de ésta (50%) en los pacientes con trasplante renal<sup>297</sup>. Como ninguna de estas manifestaciones clínicas es específica, el diagnóstico de una nefropatía crónica del aloinjerto renal requiere el diagnóstico diferencial y la exclusión de otras causas de disfunción del aloinjerto como el RA, la toxicidad por fármacos o la glomerulonefritis.

La mayor parte de los pacientes trasplantados cardíacos con VCA están asintomáticos hasta que desarrollan un infarto de miocardio silente, un fracaso cardíaco, arritmias o muerte súbita<sup>298</sup>. Las pruebas diagnósticas no invasivas no han demostrado ser una prueba de cribado válida para la VCA en trasplante cardíaco<sup>299,300</sup>. La prueba de esfuerzo tiene una aplicación limitada en estos pacientes, dada la denervación del aloinjerto cardíaco y sus respuestas anómalas. La tomografía computerizada por emisión de fotón único (SPETC) es útil para identificar la VCA en estadios avanzados, pero es de escasa utilidad para el diagnóstico en estadios precoces de la enfermedad<sup>301</sup>. Por último la ecocardiografía de estrés con dobutamina presenta una alta sensibilidad (83-95%) pero su especificidad es muy variable, con cifras que oscilan entre el 53% y el 91% según estudios<sup>302,303</sup>. Debido a todo esto, la angiografía coronaria se emplea como método de cribado y de seguimiento en la mayoría de centros. La detección angiográfica de la VCA se comporta como un factor pronóstico a largo plazo, pero esta prueba tiene

una baja sensibilidad para las lesiones precoces e infraestima la gravedad de la afectación vascular<sup>304,305</sup>. Actualmente la biomicroscopía ultrasónica (BMU) permite analizar con exactitud la morfología de la pared vascular, así como el grosor de la íntima y el tamaño de la luz. La BMU es la técnica más sensible para el diagnóstico de la VCA en estadio precoz en los aloinjertos cardíacos<sup>306</sup>. El último avance en este campo es la histología virtual, aún en fase de desarrollo, donde analizando las ondas de la BMU se realiza un análisis cualitativo de la pared vascular y se subdivide la lesión en cuatro elementos (tejido fibroso, fibrograso, necrosis franca y calcio). Gracias a esto se puede valorar la afectación mural *in vivo* y el compromiso real para el vaso<sup>307,308</sup>.

La clasificación Banff de 2007 indica que los signos histológicos y clínicos para el diagnóstico del RC en los TTCs incluyen el estrechamiento de la luz vascular, la pérdida de anejos cutáneos, la atrofia cutánea y muscular, la fibrosis en las biopsias tisulares subfasciales y la distrofia ungueal<sup>150</sup>. A pesar del número de RAs observados en los TTCs, hasta 2009 no se había observado ni un solo caso de VCA. Fue en un paciente de Louisville intervenido en 2008 de un trasplante unilateral de mano, donde se identificó por primera vez en un TTC un caso de vasculopatía con hiperplasia de la íntima. A pesar de tener unas pruebas de imagen rigurosamente normales y una histología anodina en las biopsias seriadas de piel, el RC finalmente condujo a la amputación<sup>309,310</sup>. El posterior análisis histológico del árbol arterial del aloinjerto amputado, reveló una hiperplasia masiva de la íntima vascular llegando en algunos casos a ocluir completamente la luz arterial, tanto en vasos de pequeño como de gran calibre. Por el contrario, el resto de los componentes del aloinjerto estaban relativamente poco afectados. Todas estas observaciones concuerdan con los hallazgos anatomopatológicos de la VCA en los aloinjertos cardíacos, donde el 50% de los pacientes desarrollan la vasculopatía en los primeros 12 meses y la afectación es

generalizada en todo el árbol arterial<sup>143,311-313</sup>. Las técnicas actuales para monitorizar la evolución de los TTCs, que consisten en un examen visual y funcional del aloinjerto, los poco sensibles índices braquiales, la angioRM o la angio tomografía axial computerizada (TAC) y las biopsias cutáneas seriadas, pueden ser insuficientes en cuanto a la capacidad de detección de un episodio precoz de RC potencialmente tratable. El problema de la angioRM, el angioTAC y la arteriografía, es que la distribución difusa de la VCA hace que no haya un segmento de referencia y que por tanto se infraestime la prevalencia de la vasculopatía<sup>305</sup>. El grupo de Louisville ha propuesto el cribado de los TTCs con BMU y en caso de duda la realización de una biopsia tisular profunda para la detección de la VCA, pero estas medidas aún no han logrado una aceptación generalizada<sup>310</sup>.

Recientemente se ha informado en aloinjertos cardiacos que formas asintomáticas o subclínicas de rechazo humoral están asociadas con el desarrollo del RC<sup>314-316</sup>. En el paciente de Louisville anteriormente mencionado se objetivó la presencia de C4d en los vasos del tejido adiposo del aloinjerto, a pesar de la negatividad de los AED<sup>310</sup>. Sin embargo, Kanitakis en Lyon examinó por IHQ los depósitos de C4d en cuatro TTCs con positividad para los AED, sin encontrar depósitos a ningún nivel<sup>132</sup>. Landín ha descrito dentro de un mismo aloinjerto de mano la presencia de C4d a nivel vascular, tanto en áreas de RA como en áreas sanas<sup>131</sup>. En un modelo de trasplante de mano y antebrazo en primates, también se objetivó la presencia de depósitos vasculares de C4d y el desarrollo de AED en 6/7 animales inmunodeprimidos. Sin embargo, en este mismo estudio también se detectó la presencia de C4d en piel sana del receptor<sup>317</sup>. A pesar de todos estos datos aparentemente contradictorios, la relación entre el rechazo humoral y la VCA está representada en un caso de Louisville. Un paciente de 55 años trasplantado en 2010 de ambas manos, presentó un postoperatorio tórpido con dehiscencia de

suturas, desbridamientos seriados, trombosis de la arteria radial derecha, múltiples episodios infecciosos y la amputación por isquemia arterial de la falange distal del pulgar y el 5° dedo de la mano derecha. Las mediciones por BMU en el 108 y 181 DPO detectaron un estrechamiento importante de la luz arterial, que se reflejaba en unos índices digitales disminuidos y que posteriormente fue confirmado por una biopsia tisular profunda. Los AED eran negativos pero había depósitos de C4d en los vasos profundos, sugiriendo un posible rechazo humoral. Fue tratado con inmunoglobulinas intravenosas a altas dosis y se ajustó la terapia de mantenimiento, cambiando el MMF por sirolimus. Seis semanas más tarde las mediciones por BMU demostraron que la VCA no había progresado<sup>310</sup>.

### 1.4.5 Opciones terapéuticas.

Las opciones terapéuticas para la VCA son fundamentalmente preventivas, tanto para el manejo inmunosupresor como en el control de los factores no inmunitarios, dada la escasa utilidad del tratamiento quirúrgico. Sin embargo, la mejor estrategia para prevenir el desarrollo de la VCA aún no está bien definida.

#### 1.4.5.1 Tratamiento inmunosupresor.

El uso de protocolos de inmunosupresión con ICN se considera esencial dada la disminución en la incidencia de episodios de RA y la mejora en la supervivencia global de los pacientes trasplantados<sup>318</sup>. Sin embargo, la alta prevalencia de la VCA sugiere que los ICNs no logran evitar su desarrollo. Esto puede deberse a que la VCA está mediada por vías inmunitarias diferentes (activación del complemento, AED, PMAD...), o que el uso de los ICN a largo plazo es un factor de riesgo para el desarrollo de nefropatía e HTA, ambos relacionados con el desarrollo de la VCA. Existen estudios comparativos entre la CsA y el Tac en ambos sentidos, por lo que los resultados son difícilmente interpretables. Klauss encontró una tendencia estadística ( $P = 0,08$ ) al realizar un estudio prospectivo con 82 pacientes trasplantados cardíacos, observando que los pacientes con un protocolo de mantenimiento que incluía el Tac presentaban peores valores medidos por BMU que los que se basaban en la CsA<sup>319</sup>. Sin embargo, Meiser realizó un estudio prospectivo en 60 pacientes trasplantados cardíacos aleatorizando el tratamiento entre una pauta de Tac-MMF-corticoides y otra de CsA-MMF-corticoides, encontrando que los pacientes tratados con la pauta que incluía el Tac presentaban un menor desarrollo de la VCA de manera no significativa ( $P = 0,08$ )<sup>320</sup>.

La terapia inmunosupresora con ICN se complementa generalmente con AZA o MMF. Eisen realizó un ensayo clínico controlado a tres años aleatorizando a los pacientes trasplantados cardíacos entre un protocolo con MMF y otro con AZA. Los pacientes tratados con MMF presentaron una reducción de la mortalidad por pérdida del aloinjerto a los 3 años del 35%, en comparación con el grupo tratado con AZA ( $P < 0,01$ )<sup>321</sup>. Tras el primer año post trasplante, el análisis por BMU de los vasos coronarios reveló que sólo el 23% de los pacientes con MMF presentaban un engrosamiento de la íntima de forma significativa (más de 0,3 mm), frente al 43% de los tratados con AZA ( $P = 0,005$ )<sup>322</sup>. Al margen del efecto inmunosupresor del MMF vía la inhibición de la inosina monofosfato deshidrogenasa necesaria para la síntesis del ADN linfocitario, éste también inhibe la glicosilación de las moléculas de adhesión de membrana, reduciendo así el infiltrado inflamatorio perivascular<sup>323</sup>. Como consecuencia, el uso del MMF parece más recomendado como terapia de mantenimiento que otros inmunosupresores, debido al efecto preventivo sobre la VCA.

Los inhibidores de mTOR (sirolimus y everolimus) interfieren con la señal de transducción mediada por la IL-1, pero también inhiben la proliferación de los linfocitos T y B, de los fibroblastos y de los leiomiocitos, inhibiendo así el desarrollo y progresión de la VCA, pudiendo ser una alternativa a los protocolos basados en los ICN<sup>324,325</sup>. Un ensayo clínico reciente con 600 pacientes trasplantados cardíacos demostró que la asociación de ICN con everolimus, en comparación con ICN y AZA, mejoraba los parámetros de valoración de la VCA (grosor de la íntima medida por BMU) y atenuaba su desarrollo ( $P = 0,01$ ), a pesar de que no mejoraba la supervivencia global de los pacientes trasplantados, y si empeoraba su perfil renal y lipídico (hipertrigliceridemia)<sup>326,327</sup>. Recientemente el estudio SCHEDULE en trasplantados cardíacos evaluó el efecto del Everolimus con retirada completa de los ICN, encontrado

de manera significativa ( $P < 0,01$ ) una mejoría en el grosor de la íntima medido por BMU en el grupo de Everolimus en comparación con el de tratamiento estándar con ICNs<sup>328</sup>. El tratamiento con inhibidores de mTOR parece afectar al desarrollo de la VCA, y su recomendación en pacientes trasplantados cardiacos empieza a estar recomendado por algunas guías clínicas como la de Viena (Austria)<sup>329</sup>.

#### **1.4.5.2 Control de factores no inmunitarios.**

En trasplante renal se ha intentado disminuir el impacto del DIR mediante el empleo de la superóxido dismutasa recombinante humana, disminuyendo el daño de los RLO al endotelio vascular al transformarlos en peróxido de hidrógeno. A pesar de que la administración intraoperatoria intravenosa de superóxido dismutasa prevenía el desarrollo de nefropatía crónica en el trabajo de Land<sup>330</sup>, sus resultados no han sido extrapolables a otros TOS; no encontrándose diferencias significativas en otros trabajos experimentales como el de Myllarniemi realizado en trasplante de aorta en ratas<sup>331</sup>.

Estudios del grupo de trasplante cardiaco de Stanford (EEUU) demostraron que el empleo de diltiazem, un antihipertensivo antagonista de los canales del calcio, atenúa la progresión angiográfica de la VCA en las arterias coronarias de los aloinjertos<sup>332</sup>. A pesar de que hoy en día el empleo del diltiazem es una medida estándar, más que un efecto directo de éste sobre las arterias coronarias, el verdadero responsable es la interacción del fármaco con la CsA provocando un aumento de los niveles sanguíneos de la misma. El diltiazem y el verapamilo inhiben parcialmente al citocromo P-450, implicado en el metabolismo hepático de tipo oxidativo de la CsA y provocando un aumento de sus niveles<sup>333</sup>. También hay que tener en cuenta el efecto antihipertensivo del diltiazem, ya que la mayoría de los pacientes trasplantados son hipertensos y la HTA es un factor de riesgo conocido de la VCA.

Otro factor no inmunitario susceptible de tratamiento médico es el perfil lipídico del paciente. Estudios prospectivos en trasplante cardiaco como el de Kobashigawa o el de Wenke han demostrado que las estatinas, fármacos inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa, disminuyen también la progresión de la vasculopatía crónica en los aloinjertos ( $P = 0,002$  y  $P = 0,04$  respectivamente)<sup>334,335</sup>. La mayor parte de este efecto se debe a la mejoría del perfil lipídico del paciente, ya que la hipercolesterolemia es otro conocido factor de riesgo de la VCA. Los productos fosforilados del mevalonato (un paso intermedio en la síntesis del colesterol) son esenciales para el procesamiento de las señales post traslacionales, las funciones fisiológicas de la proteína G y los receptores de los factores de crecimiento. Los inhibidores de la HMG-CoA reductasa bloquean esta vía deteniendo el ciclo celular en G1, inhibiendo la proliferación, e iniciando la apoptosis mediante el bloqueo de las rutas de señalización intracelulares<sup>336</sup>. Esto explica el efecto inmunosupresor que también poseen las estatinas, disminuyendo la citotoxicidad de las células NK y de los linfocitos, inhibiendo la proliferación de las células T y estimulando la apoptosis celular, contribuyendo todo ello a disminuir los episodios de RA, así como la incidencia y progresión de la VCA<sup>337</sup>.

El control de otros factores no inmunitarios como la hipotermia aún no está bien definido. Realizar la extracción de órganos en quirófanos adyacentes a donde se va a realizar la implantación de éstos, evitando así la fase de preservación y eliminando la necesidad de la hipotermia para el mantenimiento de los tejidos, es una opción a considerar. Sin embargo, la organización actual del sistema de trasplantes dificulta esto, ya que el donante suele estar distante de los posibles receptores y es más sencillo y económico el traslado de los distintos órganos a los hospitales donde están los



receptores, que mantener al donante con una perfusión activa de los órganos mediante asistencia mecánica y trasladar a todos los posibles receptores al hospital de origen.

#### **1.4.5.3 Opciones quirúrgicas.**

El tratamiento quirúrgico de la VCA no es una opción real. La distribución difusa y distal de las lesiones, así como la afectación (en aloinjertos cardiacos) de vasos coronarios intramurales imposibilitan la revascularización con las técnicas habituales, tales como el by-pass, la angioplastia percutánea con balón o la colocación de un stent. Sólo los pacientes con una VCA focal y segmentaria son candidatos a una angioplastia, y en estos pacientes la incidencia de recidiva es alta (55%)<sup>338</sup>. En los pacientes receptores de un trasplante cardiaco la única alternativa es el retrasplante. Sin embargo, el retrasplante cardiaco tiene una mortalidad elevada con una supervivencia al primer año del 55% en comparación con el 80% de los receptores de un trasplante primario. Además los pacientes retrasplantados con supervivencias superiores a un año, presentan una incidencia de VCA mayor debido a la mayor incidencia de episodios de RA ( $P = 0,02$ ), de hipercolesterolemia total ( $P = ,002$ ) y mayores niveles de LDL – colesterol ( $P = ,009$ )<sup>339</sup>.



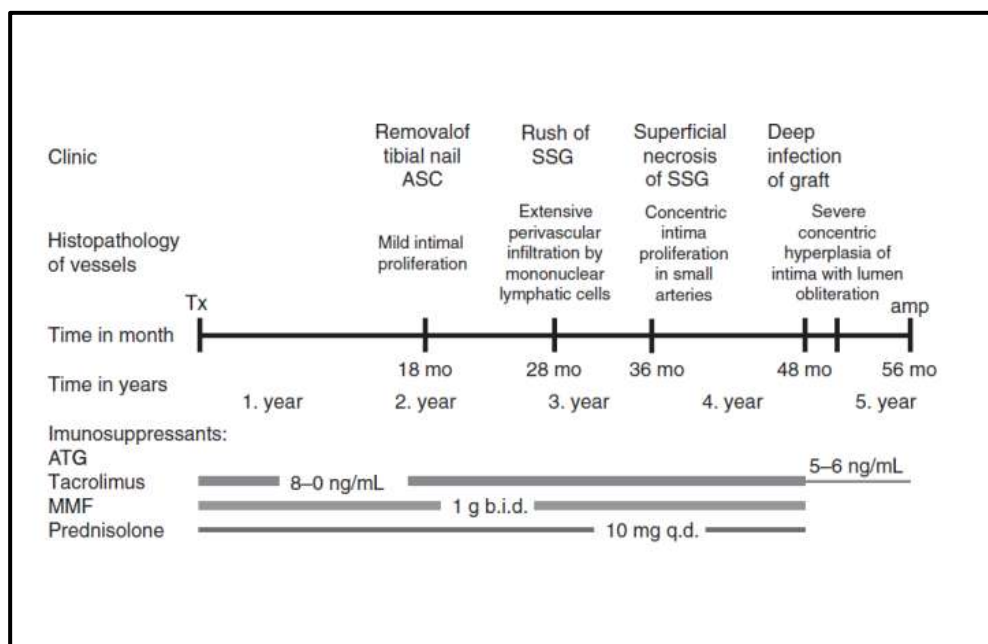
## 1.5 RECHAZO CRÓNICO EN LOS TTC.

La experiencia mundial de VCA en TTCs se reduce a pocos pacientes, sin tener ningún equipo de trasplantes una cohorte numerosa de casos a día de hoy. Los casos siguientes son los documentados hasta la fecha: el primer caso de trasplante de mano del equipo de Lyon, uno de seis aloinjertos de rodilla realizados por Diefenbeck, y todos los trasplantes de mano (seis de seis) realizados por el grupo de Louisville<sup>340</sup>.

El primer receptor del equipo de Lyon era un ciudadano neozelandés de 48 años, con una amputación traumática unilateral del tercio distal de su antebrazo derecho. El trasplante se realizó sin incidentes en septiembre de 1998, siendo el primer trasplante de mano realizado con éxito en el mundo<sup>341</sup>. Sin embargo, el paciente abandonó prematuramente tanto el seguimiento médico como la rehabilitación, tomando de manera irregular la medicación inmunosupresora y sin supervisión. Como consecuencia los resultados funcionales fueron calificados de pobres, con mínima recuperación motora y escaso rango de movilidad. Sin un correcto control inmunológico, los sucesivos episodios de rechazo y la tumefacción asociada le hicieron solicitar la reamputación del aloinjerto a los 861 DPO<sup>151,342</sup>. El posterior análisis histopatológico reveló que el aloinjerto presentaba los signos de un episodio de RA, más que los rasgos característicos de la VCA descritos previamente<sup>310</sup>. Las manifestaciones cutáneas fueron muy similares a las de una reacción de injerto contra huésped crónica de tipo liquenoide: pápulas cutáneas con aspecto de liquen plano que presentaban al análisis histológico hiperqueratosis ortoqueratótica, hipergranulosis, acantosis, dermatitis de la interfase y queratinocitos necróticos con cuerpos coloides en la epidermis y la unión dermo-epidérmica<sup>151</sup>. Sólo se encontraron infiltrados celulares mononucleares perivasculares de grado medio en los vasos del tejido muscular, los tendones y la

médula ósea, infiltrando también la pared vascular y con algún caso aislado de disrupción de la misma. Al margen de esto, no había otros signos de rechazo en estos tejidos.

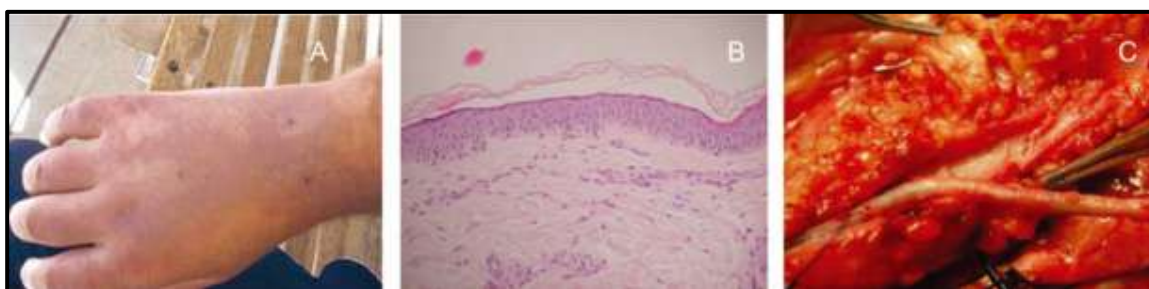
Diefenbeck publicó en 2011 un caso de VCA en uno de los seis aloinjertos de rodilla que había realizado su equipo, aportando evidencia clínica a favor de que los episodios repetidos de RA acababan desencadenando una VCA, al igual que se había descrito en un modelo experimental comentado anteriormente<sup>203</sup>. El paciente era un varón caucásico que tras un accidente de motocicleta en enero del 2000 sufrió una fractura diafisaria y supracondilar abierta de fémur grado IIIb de Gustilo. Tras varios episodios de osteomielitis, se le realizó una resección del fémur distal y de la articulación de la rodilla en 2002 y un posterior trasplante de rodilla<sup>343</sup>. Un resumen de los 5 años de evolución del paciente, con sus signos clínicos, hallazgos histológicos y tratamiento inmunosupresor se encuentra en la *Figura 10*. El paciente probablemente presentó un episodio de RA celular desde el 18 mes PO<sup>340</sup>. Los signos histopatológicos de la VCA aparecieron a partir del 36 mes PO. A los 50 meses PO el rango de movilidad (ROM) de la rodilla bajó de 0-0-90° a 0-10-40° de flexión, desarrollándose una inestabilidad anterior y encontrándose signos de necrosis en las biopsias óseas y cartilaginosas. Posteriormente el paciente sufrió una infección por *Pseudomonas aeruginosa* resistente al tratamiento médico y quirúrgico habitual. Tras comentarlo con el paciente se realizó una amputación supracondílea a los 56 mes PO<sup>37</sup>.



**Figura 10. Resumen clínico del TTC de rodilla con signos de VCA.** Clinic: clínica; removal of tibial nail ASC: retirada del clavo de tibia y artroscopia; rush of SSG: eritema en el colgajo centinela; superficial necrosis of SSG: necrosis superficial en el colgajo centinela; deep infection of the graft: infección profunda del aloinjerto; histopathology of vessels; histopatología de los vasos; mild intimal proliferation: proliferación moderada de la íntima; extensive perivascular infiltration by mononuclear lymphatic cells; importantes infiltrados linfocitarios mononucleares perivasculares; concentric intima proliferation in small arteries: proliferación concéntrica de la íntima en arterias de pequeño calibre; severe concentric hyperplasia of intima with lumen obliteration: grave hiperplasia concéntrica de la íntima con obliteración de la luz; time in month: tiempo en meses; Tx: trasplante; amp: amputación; mo: meses; time in years: tiempo en años; immunosuppressants: inmunosupresores; ATG: globulina anti timocítica (Reproducido con permiso: Diefenbeck M, Nerlich A, Schneeberger S, Wagner F, Hofmann GO. Allograft vasculopathy after allogeneic vascularized knee transplantation. Transpl Int. 2011;24(1):e1-5. Epub 2010/10/21. Copyright John Wiley and Sons).

Dentro del programa de trasplante de manos de Louisville se han detectado signos de VCA en los seis trasplantes realizados. Sólo los pacientes trasplantados en cuarto y sexto lugar desarrollaron una VCA agresiva a los 9 y 6 meses post trasplante respectivamente. El cuarto paciente era un varón diestro de 32 años con una amputación traumática por un accidente pirotécnico a nivel del antebrazo derecho. Trasplantado con éxito en julio de 2008, a los 8 meses PO el paciente presentó zonas de equimosis en el aloinjerto y dolor. El angioTAC reveló la presencia de una estenosis del 50-60% de la luz vascular desde la anastomosis en la arteria braquial hasta la mano, pero sin signos de

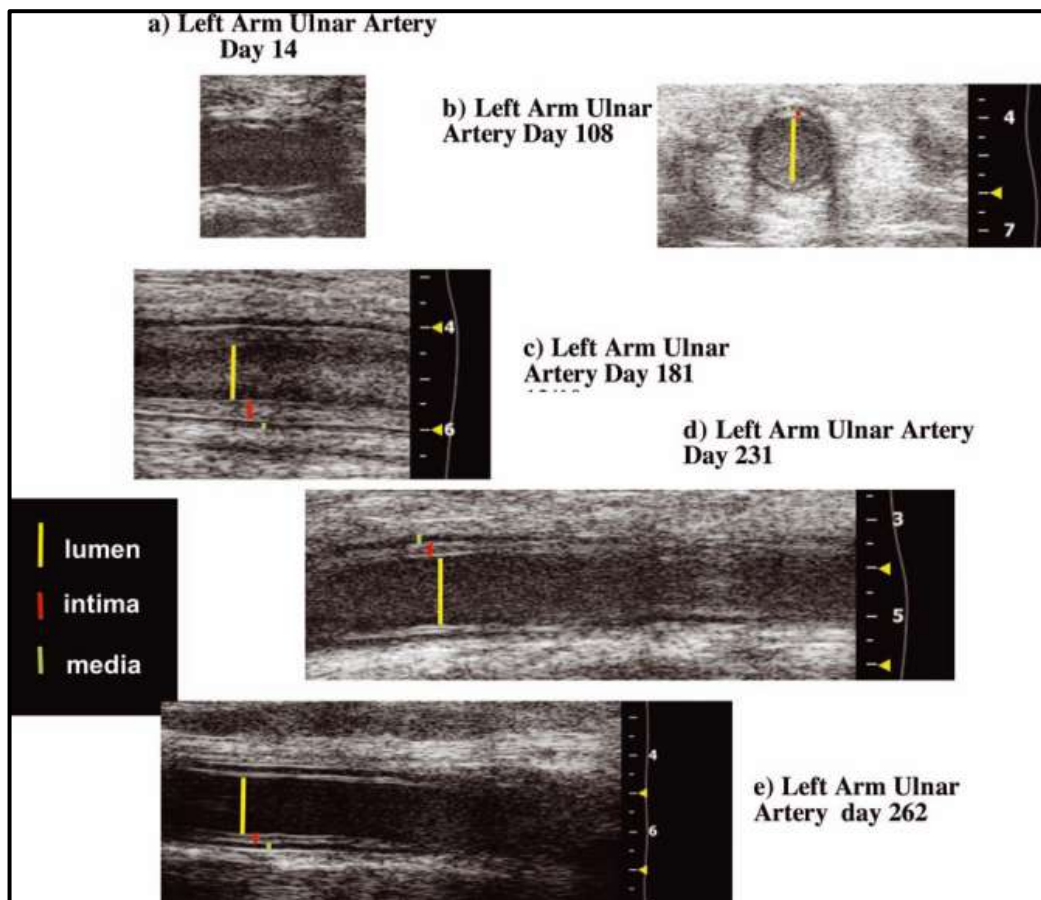
obstrucción completa. Histopatológicamente las biopsias cutáneas no presentaban apenas signos de RA (grado 0 y 1), y los AED fueron negativos (ver *Figura 11 derecha y centro*). Se realizó una administración intra-arterial de nitroglicerina que disminuyó el flujo sanguíneo a la mano por un fenómeno de robo a nivel del antebrazo, y la angioplastia a nivel de la anastomosis braquial no mejoró ni el flujo ni el dolor. Finalmente se intervino al paciente para reseca la arteria cubital e interponer un injerto de safena, objetivándose durante la cirugía un aumento del grosor de la pared arterial (ver *Figura 11 izquierda*). Los crecientes signos de isquemia obligaron a la amputación del aloinjerto al 9º mes PO, siendo éste el primer caso de rechazo crónico registrado en un TTC<sup>46,309,310</sup>. El posterior análisis histológico reveló una grave VCA en todas las arterias de la mano y afectando también al sistema venoso (a semejanza de lo observado en la VCA coronaria<sup>277</sup>). Tanto la piel, como el músculo y el tejido nervioso estaban relativamente poco afectados, presentando signos de atrofia y fibrosis atribuibles a la isquemia.



**Figura 11. Imágenes del cuarto paciente trasplantado de mano de Louisville.** *Izquierda (A):* equimosis del aloinjerto en muñeca y dorso de mano en el 269 DPO. *Centro (B):* biopsia cutánea con mínimos signos de rechazo del 275 DPO. *Derecha (C):* aspecto duro y engrosado de la arteria cubital durante el intento de revascularización del 275 DPO (Reproducido con permiso: Kaufman CL, Ouseph R, Blair B, Kutz JE, Tsai TM, Schecker LR, et al. Graft vasculopathy in clinical hand transplantation. Am J Transplant. 2012;12(4):1004-16. Epub 2012/02/14. Copyright John Wiley and Sons).

Tras lo ocurrido con el cuarto paciente, se realizaron biopsias profundas en los pacientes 1 a 3 y en el número 5. A pesar de no presentar ningún síntoma ni signo clínico de interés y de tener los controles anuales por angioRM e índices braquiales normales, todos ellos presentaron signos de VCA de grado leve<sup>310</sup>.

Por último, el sexto paciente trasplantado del programa de Louisville era un varón de 55 años con una amputación bilateral de ambas manos debido a una quemadura. Se trasplantó en agosto de 2010 y presentó un postoperatorio tórpido requiriendo varias reintervenciones para el cierre definitivo de las heridas, desbridamientos seriados debido a múltiples episodios infecciosos y la oclusión de la arteria radial de la mano derecha. La BMU del 108 y 181 DPO mostró signos de VCA con engrosamiento de las paredes vasculares (ver *Figura 12 b y c*), que posteriormente fue confirmado con una biopsia muscular y de un segmento de la primera arteria metacarpiana dorsal. Este paciente presentó negatividad para los AED circulantes, pero en las biopsias se detectaron depósitos de C4d sugiriendo un episodio de rechazo humoral. El rechazo humoral se trató con plasmaféresis y dosis elevadas de inmunoglobulinas intravenosas. Adicionalmente al paciente se le ajustó la terapia de mantenimiento, cambiando el MMF por sirolimus pero manteniendo el Tac y los corticoides. El control por BMU a las seis semanas demostró una estabilización de la VCA sin progresión del engrosamiento de la pared arterial, que se ha mantenido hasta el 262 DPO (ver *Figura 12 d y e*)<sup>310</sup>.



**Figura 12.** Imágenes de BMU del sexto paciente trasplantado de manos de Louisville. Left arm ulnar artery: arteria cubital del brazo izquierdo; day: día (Reproducido con permiso: Kaufman CL, Ouseph R, Blair B, Kutz JE, Tsai TM, Schecker LR, et al. Graft vasculopathy in clinical hand transplantation. Am J Transplant. 2012;12(4):1004-16. Epub 2012/02/14. Copyright John Wiley and Sons).



## **2 OBJETIVO E HIPÓTESIS.**



Hasta donde conocemos, el efecto histológico que la preservación en frío puede tener sobre los aloinjertos de tejidos compuestos no ha sido evaluado. El presente trabajo tiene como objetivo valorar el desarrollo de la VCA en aloinjertos sometidos a preservación en isquemia fría en comparación con el trasplante inmediato, en el contexto de un TTC experimental de extremidad posterior en ratas bajo dosis subterapéuticas de inmunosupresión.

Se establece como *hipótesis nula* ( $H_0$ ) que la preservación de los aloinjertos en isquemia fría a 4°C durante 7 horas no favorece el desarrollo de la vasculopatía fibroproliferativa en los tejidos trasplantados. Como *hipótesis alternativa* ( $H_1$ ), se establece que la preservación de los aloinjertos en isquemia fría a 4°C durante 7 horas favorece el desarrollo de la vasculopatía fibroproliferativa en los tejidos trasplantados.

Además, se establecen como objetivos secundarios:

1. Analizar el infiltrado leucocitario en biopsias tisulares no cutáneas.
2. Analizar la expresión génica de las citoquinas en el tejido trasplantado.
3. Adquirir destreza en técnicas microquirúrgicas.



### **3 MATERIAL Y MÉTODOS.**



### 3.1 PROTOCOLO QUIRÚRGICO EXPERIMENTAL.

Se realizaron 30 transferencias de patas traseras entre ratas (*Rattus Norvegicus*) con distintas técnicas de preservación cruzando el complejo mayor de histocompatibilidad<sup>344</sup>. Los animales se distribuyeron en dos grupos de experimentación según la técnica de preservación empleada. El grupo I fue sometido a trasplante inmediato a temperatura ambiente tras la extracción del aloinjerto en el animal donante. En el grupo II el aloinjerto se sometió a un periodo de isquemia fría a 4°C durante 7 horas previo al trasplante (ver *Tabla 1*). Los animales trasplantados se mantuvieron con vida durante un periodo de 2 meses<sup>345,346</sup>.

	<b>Técnica</b>	<b>N</b>	<b>Recuperación</b>	<b>Análisis</b>
<b>Grupo I</b>	Trasplante inmediato a temperatura ambiente	6	2 meses tras el trasplante	Efecto del frío sobre el rechazo crónico
<b>Grupo II</b>	Trasplante tras 7 horas de isquemia fría a 4°C	6		

*Tabla 1. Esquema de los grupos de experimentación*

Se utilizaron treinta ratas Wistar-Lewis (LEW RT1<sup>l</sup>) como receptoras y quince ratas Lewis Brown-Norway (LBN RT1<sup>n</sup>) como donantes, de 250-280 gramos de peso. Para reducir el número de animales empleados se extrajeron ambas patas posteriores de cada rata donante<sup>347</sup>. Para ello se anestesió 3 animales simultáneamente en cada intervención: primero se extraían las dos patas posteriores de una rata LBN, posteriormente se sacrificaba al animal donante, y a continuación se realizaban ambos trasplantes. Todas las ratas utilizadas en el estudio recibieron un trato digno, de acuerdo con la Directiva del Consejo de Europa publicada el 22 de septiembre de 2010 (2010/63/UE).

Los procedimientos se realizaron bajo condiciones de asepsia, y durante la intervención los animales se mantuvieron calientes con la temperatura estable gracias a una manta eléctrica. La cirugía se realizó con anestesia inhalatoria, realizando primero la inducción con isoflurano al 5% (Forane<sup>®</sup>, Abbott) y manteniendo posteriormente al animal con una mascarilla al 2%. Como suplemento de fluidos se inyectaron 7 ml de suero salino fisiológico (SSF) por vía subcutánea (s.c.), distribuidos de la siguiente forma: 2 ml antes de iniciar la intervención, 3 ml antes de la reperusión del aloinjerto y 2 ml al finalizar la cirugía. Tras la intervención quirúrgica los animales se estabularon en celdas individuales en condiciones aislamiento en un rack ventilado, con pienso y agua a demanda. La analgesia postoperatoria se realizó administrando tramadol 20 mg/kg/12h s.c. durante los primeros 2 DPO<sup>348</sup>. Junto a la analgesia se administró profilaxis antibiótica con enrofloxacino 5-10 mg/kg/24h s.c.

Para evaluar el protocolo quirúrgico experimental, se recogieron las siguientes variables:

1. Tiempo de intervención (minutos): empezando a contar desde el inicio de la disección inguinal en el animal receptor, hasta el cierre cutáneo.
2. Tiempo de microcirugía (minutos): empezando a contar desde el inicio de la anastomosis arterial hasta el final de la anastomosis venosa, tras verificar que ambas eran permeables y sin fugas.
3. Supervivencia del animal (Si/No).
4. Orden de intervención (1º/2º): según el trasplante fuese el primero o el segundo de los dos realizados de forma consecutiva.
5. Técnica de preservación (isquemia caliente/isquemia fría).



6. Complicación intraoperatoria (Si/No): entendiéndose como una complicación intraoperatoria el que hubiese un sangrado a través de la microanastomosis que obligase a dar más puntos de sutura; que la anastomosis no fuese permeable, requiriendo una nueva reanastomosis; o el fallecimiento intraoperatorio del animal, ya fuese por hipotermia o por un tapón mucoso traqueal.

### **3.1.1 Extracción del aloinjerto.**

Se colocó al animal en decúbito supino. El campo quirúrgico se preparó rasurando el pelo de la pata posterior y de la ingle, acondicionando la piel con povidona yodada en solución al 10% (Betadine<sup>®</sup>, Meda), y empleando pomada epitelizante (Oculos<sup>®</sup>, Novartis) para proteger los ojos del animal. Utilizando un bisturí frío del n°15 se realizó una incisión horizontal en la pata posterior de la rata a nivel del 1/3 medio del muslo. Se ligó con seda de 6/0 las ramas epigástricas en su porción más proximal, rebatiendo el colgajo abdominal hacia el abdomen. A continuación se disecó el paquete vasculonervioso femoral, ligando en su cara posterior los vasos circunflejos femorales. Se prolongó la disección vascular hasta la región inguinal, tomando como límite proximal el ligamento inguinal. A continuación se realizó la disección muscular con ayuda de un electrocauterio bipolar y un electrocauterio oftalmológico de baja temperatura de punta fina (Bovie<sup>®</sup>, Aaron), seccionando la musculatura de medial a lateral, en dirección a la rodilla del animal. Se realizó la sección del nervio ciático con bisturí frío y desarticuló la pata a nivel de la rodilla. Por último se seccionaron la arteria, vena y nervio femorales<sup>344</sup>. A continuación se realizó la misma maniobra en la pata contralateral para obtener los dos aloinjertos de la rata LBN donante<sup>347</sup>. Tras la extracción de ambas extremidades se sacrificó al animal con una inyección intracardiaca de 1 ml de cloruro potásico, y se comprobó tanto la ausencia de pulso como de respiración.

Los aloinjertos pertenecientes al grupo II se perfundieron con 20 ml de SSF a 4°C a través de la arteria femoral. A continuación se envolvieron en una gasa empapada en SSF frío y se colocaron los aloinjertos en una bolsa estanca, y ésta en un recipiente de agua con hielo a 3-4°C, hasta cumplir 7 horas. Los aloinjertos que no precisaron un tiempo de isquemia fría fueron trasplantados de manera inmediata al animal receptor.

### **3.1.2 Técnica quirúrgica en el animal receptor.**

Se rasuró la región inguinal y se realizó una incisión oblicua a lo largo del pliegue inguinal, para exponer el paquete vasculonervioso femoral a su paso bajo el ligamento inguinal. Se disecaron los vasos femorales y se ligó con seda de 6/0 la arteria y vena femoral proximalmente a la salida de la arteria epigástrica, preparándose el segmento proximal a la ligadura para la anastomosis término-terminal con el pedículo del aloinjerto. Para facilitar el procedimiento, primero se aseguró el aloinjerto mediante suturas de piel de seda de 4/0, previo a la anastomosis microquirúrgica con sutura monofilamento irreabsorbible de 10/0 con aguja de 5.1 mm 3/8c (Ethilon<sup>®</sup>, Johnson & Johnson)<sup>344</sup>. Las anastomosis vasculares fueron todas termino-terminales tanto para la arteria como para la vena femoral, realizándose a nivel inguinal y empleando los vasos femorales en todas las ratas receptoras. No se realizaron neurorrafias, miorrafias ni osteosíntesis de ningún tipo. A continuación se eliminó el componente cutáneo de los aloinjertos de pata de LBN desepidermizándolos en su totalidad y se amputó la pieza a nivel del tobillo tras ligar el paquete tibial posterior. El aloinjerto se enterró en posición heterotópica a nivel inguinal tras un amplio socavamiento de la piel abdominal (ver *Figura 13*). Finalmente se realizó un cierre directo del bolsillo con puntos de colchonero horizontales con seda de 4/0 y se aplicó povidona yodada en solución al 10% en la incisión (Betadine<sup>®</sup>, Meda).



**Figura 13. Protocolo experimental: detalles quirúrgicos.** *Superior izquierda:* aloinjerto de pata trasera de LBN, inmediatamente tras su extracción de la rata donante. *Superior derecha:* colocación del aloinjerto en la zona receptora inguinal de la rata LEW. *Medio izquierda:* cierre directo de la zona receptora tras las anastomosis microquirúrgicas. *Medio derecha:* detalle del pedículo vascular y la zona receptora a los dos meses de la cirugía. *Inferior izquierda:* aloinjerto de pata trasera de LBN tras su extracción de la rata receptora a los dos meses. *Inferior derecha:* aloinjerto de pata trasera previo a su procesamiento histológico, con esquema de los segmentos a estudio; vasos femorales (VF), tercio medio ( $\frac{1}{3}$  M) y tercio distal ( $\frac{1}{3}$  D).

### **3.1.3. Protocolo de inmunosupresión.**

Los animales receptores recibieron terapia inmunosupresora diaria con CsA a dosis subterapéuticas (Sandimmun® de Novartis, Basel, Suiza). Los primeros 7 días postoperatorios las dosis de inducción fueron de 2 mg/Kg/día s.c. Posteriormente las dosis de mantenimiento a partir de la primera semana y hasta finalizar los 2 meses fueron de 1 mg/Kg/día s.c.<sup>203,204,212</sup>.

### **3.1.4. Protocolo de extracción.**

Cuando se cumplieron los dos meses postoperatorios, los animales fueron anestesiados para la extracción y posterior análisis de los aloinjertos (ver *Figura 13*). Tras la extracción, el animal receptor se sacrificó con una inyección intracardiaca de 1 ml de cloruro potásico y se ratificó la ausencia de pulso y respiración.

## 3.2 ESTUDIO HISTOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO.

### 3.2.1 Procesamiento de las muestras.

Todas las muestras de tejido fresco se fijaron de manera individual en tampón de formalina al 10% con un pH = 7 durante 24 - 48 horas a temperatura ambiente. Cada aloinjerto se dividió a su vez en tres muestras distintas: tercio medio del aloinjerto, tercio distal y vasos femorales (incluyendo la anastomosis vascular) (ver *Figura 13 inferior derecha*). Una vez fijadas, se incluyeron las muestras de manera independiente en parafina, previa deshidratación en etanol a concentraciones crecientes según protocolo estándar. Una vez obtenido el bloque de tejido parafinado, se realizaron 30 cortes seriados (5 µm) en microtomo (Leica® RM2555) recogiendo las secciones de tejido en portas tratados Dako® (FLEX IHC Microscope Slides de Dako®, California, EEUU), para su posterior procesamiento. En cortes a distintas alturas de cada muestra, se realizaron las siguientes tinciones histológicas<sup>212</sup>:

1. Orceína nítrica: con núcleos en verde claro y fibras elásticas en marrón.
2. Tricrómico de masson: con núcleos azul negruzco; citoplasma, queratina, fibras musculares y eritrocitos en rojo; colágeno y reticulina en azul.
3. H-E: con núcleos en azul; citoplasma y fibrina en rosa; glóbulos rojos y musculatura en rojo anaranjado.

Para el procesado IHQ de las muestras, se desenmascararon los antígenos (CD3, CD4, CD8, CD20, CD68 y C4d) con un protocolo ajustado para cada anticuerpo primario mediante el sistema PTLINK Dako® (Pre-Treatment) con calor a 90°C y distintos pHs. El equipo de tinción empleado fue el Autostainer Plus de Dako®,

siguiendo las recomendaciones del fabricante. Tras el bloqueo de la peroxidasa endógena y el de unión inespecífica, se realizó la incubación con el anticuerpo primario y secundario, empleando entre ambos tampón de lavado (Wash buffer Dako®). Posteriormente se incubaron las muestras con peroxidasa streptavidina (Streptavidin horseradish peroxidase conjugate, SouthernBiotech®, Birmingham, Inglaterra) y con el cromógeno según prospecto (Dako® REAL™ Detection System K5003). Tras la contratinción con hematoxilina, se procedió al montaje y deshidratación de las secciones. Los resultados mostraron los núcleos en azul-violeta y las células positivas en marrón.

Las muestras se estudiaron mediante un sistema de análisis de imagen compuesto por un microscopio Olympus® BX14 (Olympus®, Tokio, Japón) acoplado a una cámara, empleando también el software Image ProPlus® (Media Cybernetics®, Washington, EEUU) de análisis de imagen. Las imágenes se tomaron con una magnificación de  $\times 200$ ,  $\times 400$  y  $\times 1000$ .



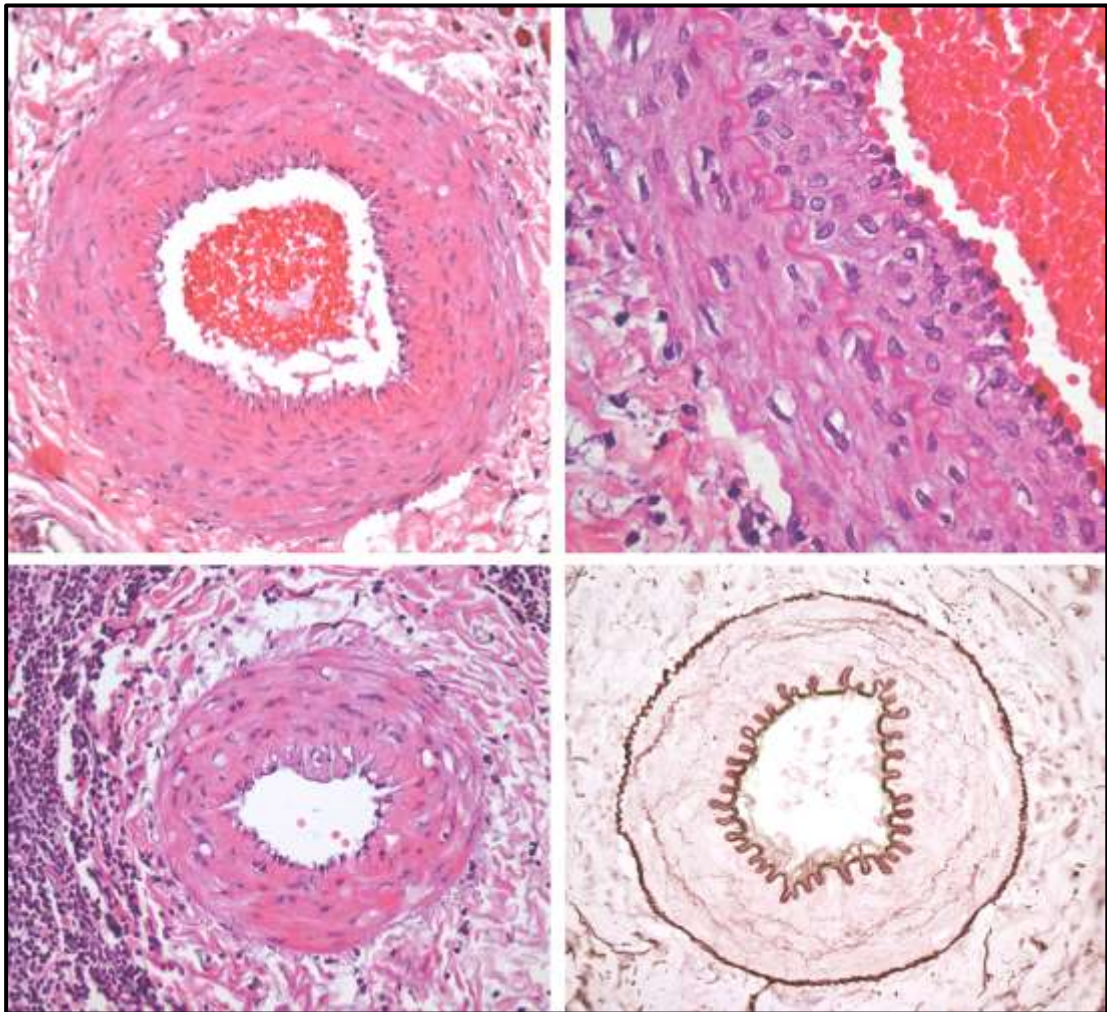
### 3.2.2 Valoración de la vasculopatía crónica del aloinjerto.

En cada muestra de vasos femorales con preparación de orceína nítrica, se escogieron cinco niveles al azar de manera enmascarada tanto en el segmento correspondiente al animal receptor como en el del aloinjerto. Dada la afinidad de la orceína nítrica por las fibras elásticas, se pudieron realizar las siguientes mediciones en cada nivel muestreado (ver *Figura 14*):

1. Presencia de VCA en vaso de gran calibre ( $>120\mu\text{m}$ ): si/no.
2. Proliferación intimal (PI): porcentaje del grosor total de la pared arterial que ocupa la íntima.  $(\text{Íntima} / (\text{íntima} + \text{media})) \times 100^{203}$ .
3. Porcentaje de permeabilidad arterial (PPA) en vaso de gran calibre ( $>120\mu\text{m}$ ): porcentaje de la luz arterial que es permeable al flujo y no ha sido ocupado por la neoíntima. Se determinó como la relación del área de la neoíntima / área de la lámina elástica interna  $\times 100^{212}$ .

En las muestras de tercio medio y distal con preparación de orceína nítrica, se escogieron cinco niveles al azar de manera enmascarada en cada tercio y se realizaron las siguientes mediciones en cada nivel muestreado (ver *Figura 14*):

1. Presencia de VCA vaso calibre pequeño-mediano ( $<120\mu\text{m}$ ): si/no.
2. PPA en vasos de pequeño-mediano calibre ( $<120\mu\text{m}$ ).
3. Media de vasos sanos y de vasos con vasculopatía en cada tercio, realizando la medición en cinco campos microscópicos ( $\times 200$ ) al azar en cada muestra, para valorar la afectación a los distintos niveles<sup>203</sup>.



**Figura 14. Valoración de la VCA.** *Superior izquierda* ( $\times 200$ ): vasos femorales ( $>120\mu\text{m}$ ), tinción de H-E, con signos de VCA incipiente en su margen derecho. *Superior derecha* ( $\times 400$ ): detalle de hiperplasia intimal, tinción de H-E. *Inferior izquierda* ( $\times 400$ ): Vaso de mediano y pequeño calibre ( $<120\mu\text{m}$ ) con signos de vasculopatía, tinción de H-E. *Inferior derecha* ( $\times 400$ ): Vaso de mediano y pequeño calibre ( $<120\mu\text{m}$ ) con mínima hiperplasia intimal, tinción de orceína nítrica, en verde el detalle de las mediciones del porcentaje de permeabilidad arterial.

### **3.2.3 Valoración de la fibrosis.**

Se escogieron de manera enmascarada cinco niveles al azar en las muestras de tercio medio y distal con tinción de tricrómico de masson, con una alta afinidad por las fibras de colágeno tipo I. Se muestrearon de manera aleatoria cinco campos microscópicos ( $\times 200$ ) para valorar la presencia o no de fibrosis por dos observadores distintos. Se valoró la fibrosis de manera semicuantitativa de 0 a 3 (0: nada; 1: leve; 2: moderada; 3: intensa). Se obtuvo una media del grado de fibrosis de los distintos tercios respectivamente (ver *Figura 15 superior*)<sup>203,212</sup>.

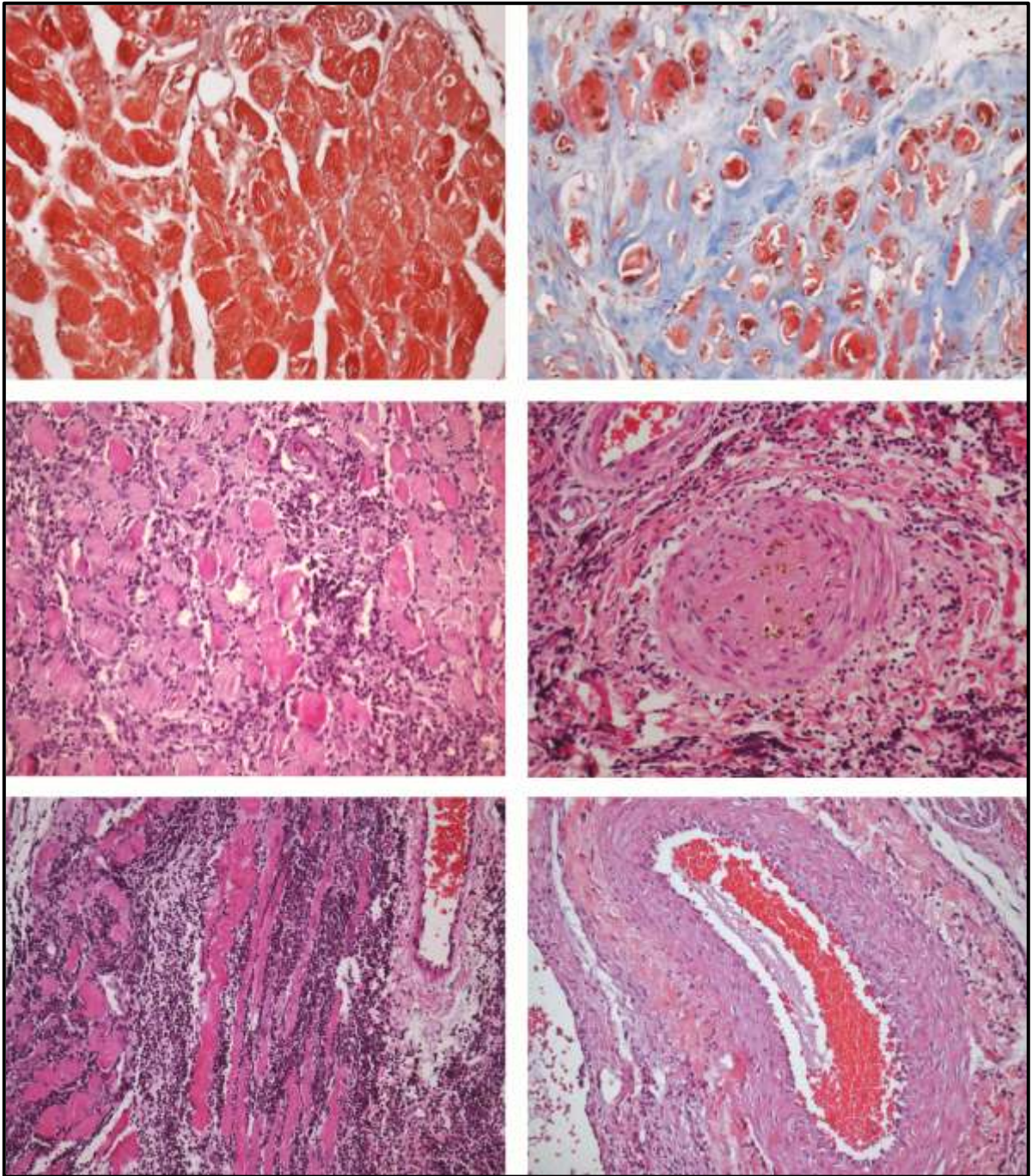
### **3.2.4 Valoración del infiltrado leucocitario.**

#### **3.2.4.1 Cuantitativa.**

En las muestras de tercio medio y distal con tinción de hematoxilina-eosina, se escogieron de manera enmascarada cinco niveles al azar en cada tercio. Se muestrearon de manera aleatoria cinco campos microscópicos ( $\times 200$ ) para valorar la presencia o no de infiltrado leucocitario por dos observadores distintos. Los infiltrados se valoraron en tejido muscular, nervioso y tendinoso de manera semicuantitativa de 0 a 4 (0: nada; 1: leve; 2: moderada; 3: intenso; 4: muy intenso).

Se realizó el mismo procedimiento semicuantitativo para valorar el infiltrado leucocitario perivascular en las muestras de vasos femorales con tinción de hematoxilina-eosina, tanto en el segmento correspondiente al animal receptor como en el del aloinjerto (ver *Figura 15 medio e inferior*).





**Figura 15. Valoración de la fibrosis y del infiltrado leucocitario.** *Superior izquierda* ( $\times 200$ ): tejido muscular, tinción de tricrómico de masson, grado 0 de fibrosis. *Superior derecha* ( $\times 200$ ): tejido muscular, tinción de tricrómico de masson, grado 3 de fibrosis. *Medio izquierda* ( $\times 200$ ): tejido muscular, tinción de H-E, infiltrado leucocitario grado 3. *Medio derecha* ( $\times 200$ ): tejido nervioso, tinción de H-E, infiltrado leucocitario grado 2. *Inferior izquierda* ( $\times 200$ ): tejido tendinoso, tinción de H-E, infiltrado leucocitario grado 4. *Inferior derecha* ( $\times 200$ ): vasos femorales ( $>120\mu\text{m}$ ), tinción de H-E, infiltrado leucocitario grado 2.

### 3.2.4.2 Cualitativa.

Se realizó un estudio IHQ para distintos antígenos (CD3, CD4, CD8, CD20 y CD68), con el objetivo de diferenciar cualitativamente los subtipos celulares del infiltrado leucocitario en las muestras tisulares de tercio medio y distal. Se escogieron cinco niveles al azar de manera enmascarada en cada tercio y se muestrearon de manera aleatoria tres campos microscópicos ( $\times 200$ ) para cuantificar el número de células positivas por campo por dos observadores distintos (ver *Figura 16*).

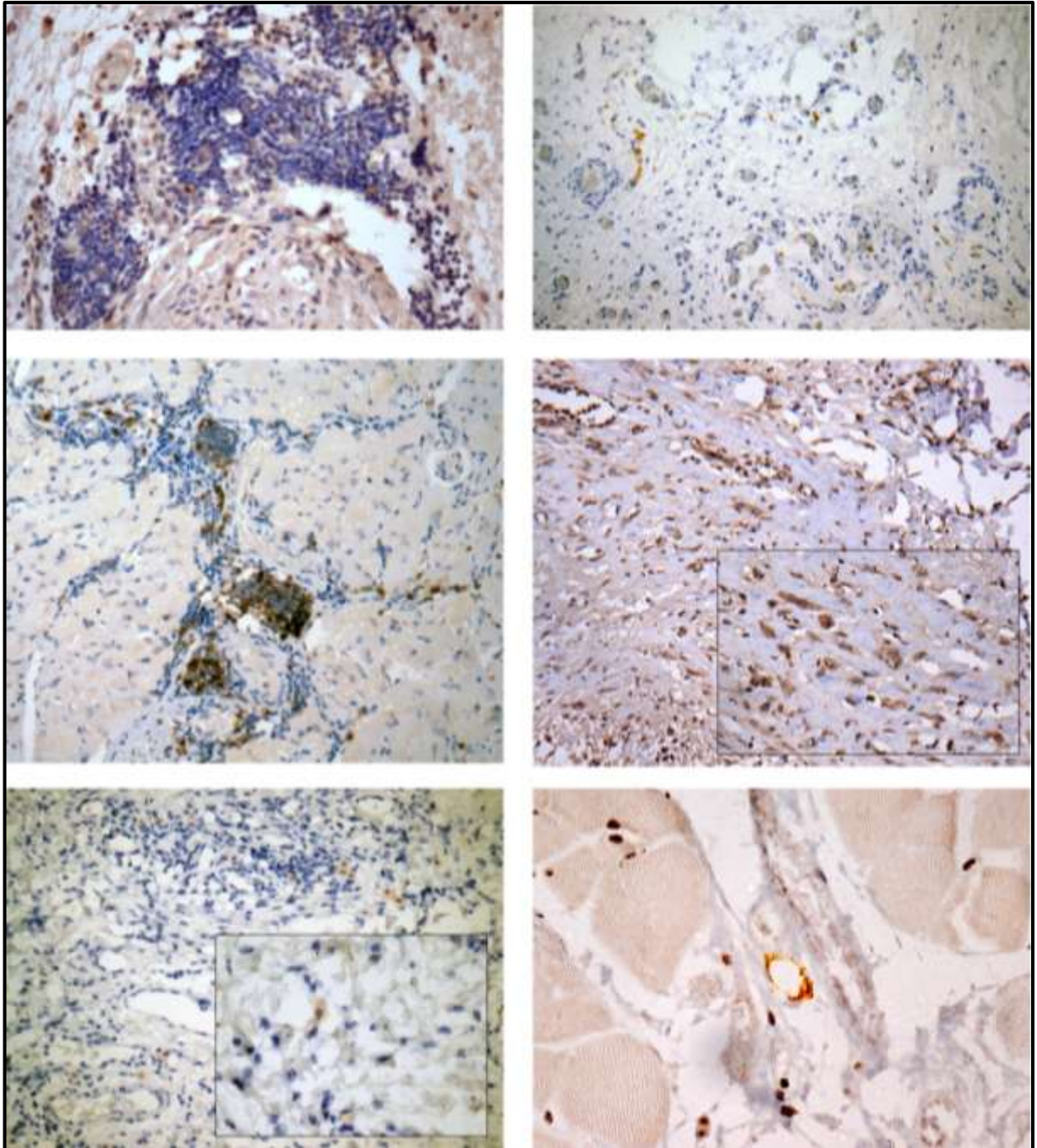
### 3.2.5 Valoración del rechazo humoral.

Adicionalmente al conteo de los linfocitos B CD20<sup>+</sup> presentes en el infiltrado leucocitario, el rechazo humoral se valoró también según la presencia o no del fragmento del complemento C4d a nivel intravascular. Se eligieron de manera enmascarada cinco niveles al azar en cada tercio medio y distal. Se muestrearon de manera aleatoria tres campos microscópicos ( $\times 200$ ) para cuantificar el depósito de C4d por campo por dos observadores distintos (ver *Figura 16 inferior derecha*). El depósito de C4d se estadificó según la clasificación Banff del 2007 para patología de aloinjertos renales (ver *Tabla 2*)<sup>131,349</sup>.

Estadio	Depósitos intravasculares de C4d	Consideración de los depósitos
<b>C4d0</b>	Indetectables	“No hay depósitos”
<b>C4d1</b>	< 10% de los capilares	“Depósitos mínimos”
<b>C4d2</b>	10% - 50% de los capilares	“Depósitos focales”
<b>C4d3</b>	> 50% de los capilares	“Depósitos difusos”

**Tabla 2.** Estadificación de los depósitos de C4d según la clasificación Banff del 2007.





**Figura 16. Valoración cualitativa del infiltrado leucocitario y del rechazo humoral.** *Superior izquierda* ( $\times 400$ ): detalle del infiltrado leucocitario perivascular con IHQ para  $CD3^+$ . *Superior derecha* ( $\times 200$ ): tejido conectivo con IHQ para  $CD4^+$ . *Medio izquierda* ( $\times 200$ ): infiltrado leucocitario intramuscular con IHQ para  $CD8^+$ . *Medio derecha* ( $\times 200$ ): tejido conectivo con IHQ para  $CD20^+$ , con detalle del infiltrado a  $\times 400$ . *Inferior izquierda* ( $\times 200$ ): infiltrado leucocitario perivascular con IHQ para  $CD68^+$ , con detalle de uno de los macrófagos marcados a  $\times 400$ . *Inferior derecha* ( $\times 400$ ): detalle de tejido muscular con IHQ para C4d intravascular.

### **3.3 EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS CITOQUINAS.**

Los marcadores de las reacciones inflamatorias producidas en el rechazo se midieron mediante "arrays" de proteínas (Ray-Biotech) en muestras musculares. El estudio se focalizó en las siguientes citoquinas: TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10.

#### **3.3.1 Aislamiento del ácido ribonucleico.**

El ARN total se obtuvo del tejido muscular de los aloinjertos utilizando el reactivo TRI-Reagent de Sigma<sup>®</sup> (San Luis, MO, EEUU) siguiendo las indicaciones del fabricante. El ARN aislado se trató con DNAsa I libre de RNAsas de Amersham Biosciences<sup>®</sup> (Piscataway, NJ, EEUU) obteniendo la muestra de ARN de partida para sintetizar el ADNc, que fue previamente cuantificado por espectrofotometría ultravioleta. El reactivo TRI-Reagent permite aislar de una misma muestra biológica tanto el ARN, como el ADN y las proteínas. Se purificó la fracción proteica, siguiendo las indicaciones proporcionadas por Sigma<sup>®</sup>.

### 3.3.2 Cuantificación del ácido ribonucleico mensajero.

Partiendo de 1 µg de ARN libre de ADN obtenido según el punto anterior, se sintetizó el ADNc utilizando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription de Applied Biosystems® (Foster City, CA, EEUU).

Los niveles de expresión de cada uno de los genes estudiados se analizaron mediante el ADNc en reacciones de PCR cuantitativa (Q-PCR) en tiempo real. Para ello se utilizó el sistema LightCycler de Roche Farma® (Basel, Suiza). Las reacciones de Q-PCR se realizaron utilizando el kit Quantimix Easy SYG de Biotools® (Madrid, España). Los cebadores específicos se encuentran detallados en la *Tabla 3*. Todos ellos fueron sintetizados, desalados y purificados mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) por Bonsai Biotech® (Alcobendas, Madrid). Los resultados obtenidos para cada uno de los genes analizados se normalizaron con respecto a la expresión del gen codificante para la  $\beta$ -actina.

	Secuencia
<b>IL-6</b>	5'-CACTTCACAAGTCGGAGGCT-3' 5'-TCTGACAGTGCATCATCGCT-3'
<b>IL-10</b>	5'-CCTCTGGATACAGCTGCGAC-3' 5'-GTAGATGCCGGGTGGTTCAA-3'
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	5'-GATCGGTCCCAACAAGGAGG-3' 5'-ACTGATGAGAGGGAGCCCAT-3'
<b><math>\beta</math>-actina</b>	5'-CGCGAGTACAACCTTCTTGC-3' 5'-CGCAGCGATATCGTCATCCA-3

*Tabla 3.* Secuencia de los cebadores utilizados en la PCR cuantitativa.



El número de copias de ADNc de cada uno de los genes de interés se determinó usando una curva estándar de siete puntos específica para cada gen. Para ser aceptadas como válidas, los coeficientes de correlación ( $R^2$ ) de estas curvas fueron siempre  $> 0,98$ . Las curvas se realizaron en paralelo para cada reacción de PCR-Q, además de las muestras en las que se deseaba cuantificar la expresión.

Para confirmar la especificidad de los productos de la reacción en cada experimento, se analizaron los perfiles de desnaturalización de cada grupo de muestras, utilizando el LightCycler. Estos perfiles se determinaron manteniendo la reacción a 80 °C durante 10 segundos y luego calentando hasta 95 °C a una tasa de calentamiento de 0.1 °C / segundo. A lo largo de este proceso se midió la fluorescencia emitida de manera continua. Este análisis demostró que para cada par de cebadores el producto de la amplificación era un único amplicón.

Al finalizar cada reacción de Q-PCR, los productos de la amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa, tiñéndolos con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y analizándolos por transiluminación ultravioleta. En todos los casos se verificó que para cada par de cebadores el producto de amplificación era una única banda del tamaño esperado.

Cada programa de Q-PCR consistió en 45 ciclos específicos según el par de cebadores, con un paso previo de desnaturalización y activación de la polimerasa de 5 minutos a 95 °C.



### **3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Los datos se procesaron informáticamente mediante una base de datos en formato Microsoft Excel® (Microsoft, Redmond, WA, EEUU), que más tarde fue importada para su tratamiento estadístico en el programa SPSS® versión 11.5 (IBM, Armonk, NY, EEUU). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquellas que presentaron una probabilidad de error menor del 5% ( $P < 0,05$ ).

Las variables cuantitativas continuas se describieron como media y desviación estándar. Las variables cualitativas se describieron mediante frecuencias absolutas y frecuencias relativas expresadas en porcentaje. El análisis descriptivo de variables cualitativas se representó de forma gráfica como sectores, barras o BoxPlot.

Las comparaciones entre variables cuantitativas continuas se realizaron mediante pruebas no paramétricas, utilizando el test de la U de Mann-Whitney. En caso de comparaciones apareadas entre variables cuantitativas continuas, se realizó un estudio pareado junto con un análisis de tendencia. Para el primero se utilizó el test no-paramétrico de Wilcoxon (o test de los signos) y para el segundo el ANOVA de medidas repetidas, junto con el test de Greenhouse-Geisser. Cuando el resultado era significativo, se empleó el test a posteriori de Bonferroni (Bonferroni Post Hoc Test) para explorar todas las posibles diferencias entre momentos dos a dos.



## **4 RESULTADOS.**



#### 4.1 RESULTADOS DEL PROTOCOLO QUIRÚRGICO.

Se logró una supervivencia del 40% de las ratas intervenidas (12 viables de 30 operadas). El tiempo medio de intervención fue de 164 minutos (120 – 255 minutos) y el tiempo medio de microcirugía fue de 106 minutos (60 – 195 minutos). No se encontraron diferencias significativas entre el tiempo de microcirugía y la supervivencia de los animales intervenidos ( $P = 0,075$ ). Entre los animales que no superaron la intervención quirúrgica, el 69,2% presentaron una complicación durante ésta, mientras que entre los que si la superaron sólo el 25% presentó una complicación intraoperatoria. Esta diferencia si fue estadísticamente significativa ( $P = 0,047$ ). La presencia de una complicación intraoperatoria no se asoció ni con el orden de intervención ( $P = 0,411$ ), ni con las distintas técnicas de preservación ( $P = 0,695$ ). Respecto a la supervivencia de los animales, ni el distinto método de preservación de los aloinjertos ni el orden de la intervención presentaron diferencias significativas ( $P = 0,695$  y  $P = 0,411$  respectivamente). Los animales intervenidos en primer lugar fueron trasplantes inmediatos en un 62,5% de los casos, y los intervenidos en segundo lugar correspondían al grupo de isquemia fría en un 88,9%, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $P = 0,033$ ). Se realizó un análisis estratificado para controlar el orden como posible factor de confusión y comprobar si la técnica de preservación afectaba a la supervivencia del animal. Los resultados no fueron significativos ni para los animales intervenidos en primer lugar ( $P = 0,633$ ), ni para los intervenidos en segundo lugar ( $P = 0,333$ ).





## **4.2 RESULTADOS HISTOLÓGICOS Y RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICOS.**

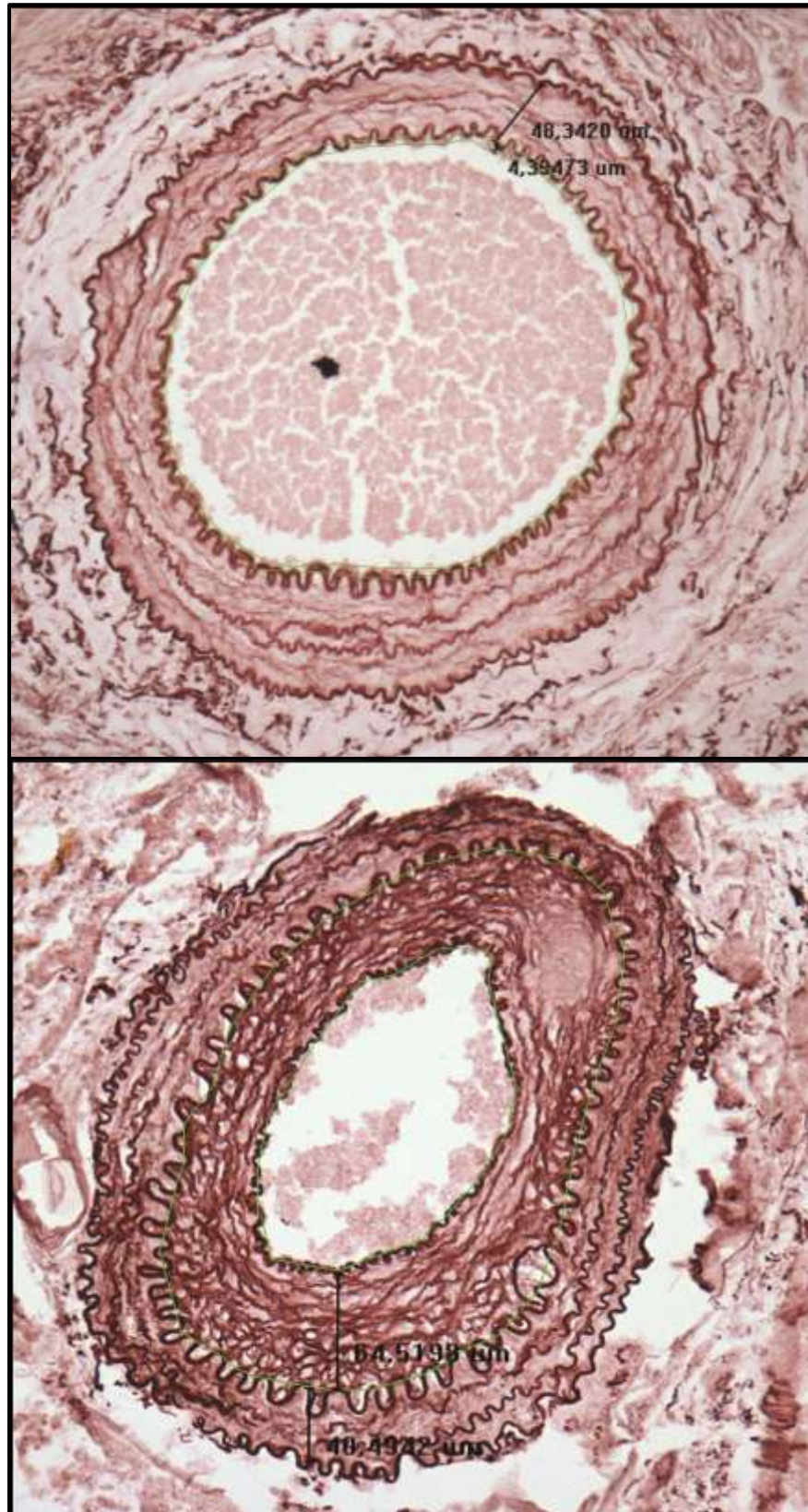
### **4.2.1 Resultados de la vasculopatía crónica del aloinjerto.**

Los resultados de los parámetros recogidos para la valoración de la VCA, tanto en los vasos femorales como en los tercios medio y distal del aloinjerto, se encuentran recogidos en la

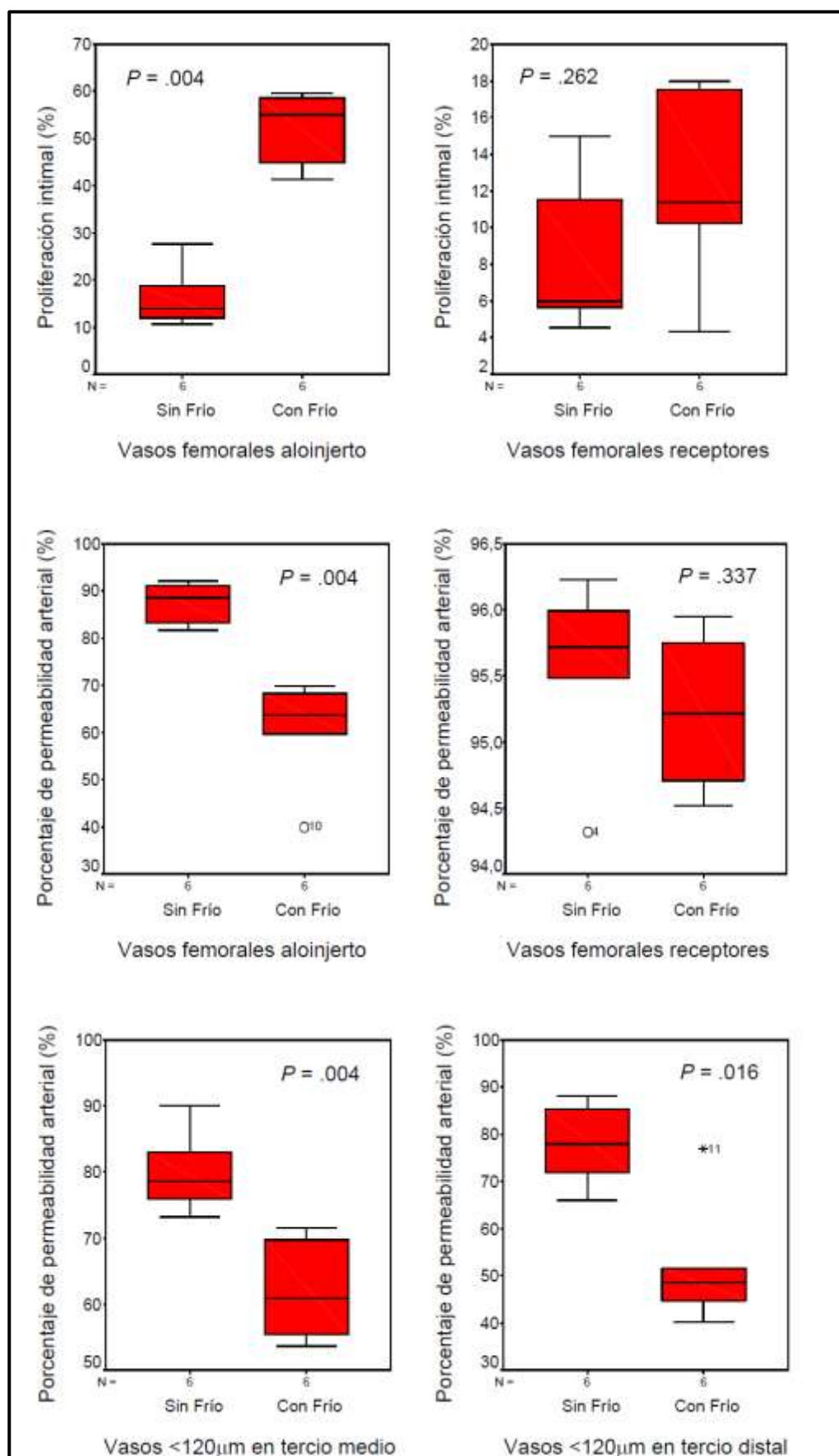
*Tabla 4.* En la *Figura 17* se puede ver el detalle de las mediciones de la PI y el PPA en los vasos femorales. La representación en boxplot de las comparaciones entre las PI, y entre los PPA, se encuentran en la *Figura 18*. En la *Figura 19* está la representación en diagrama de barras de las medias de vasos sanos y patológicos por campo en los distintos niveles.

VARIABLES	Vasos femorales del aloinjerto		P	Tercio medio del aloinjerto		P	Tercio distal del aloinjerto		P
	TI	IF		TI	IF		TI	IF	
Presencia de VCA (%)	93,33%	100%	0,699	6,66%	66,66%	<b>0,004**</b>	20%	76,66%	<b>0,004**</b>
Media de PI (%)	16,13 ± 6,42%	52,44 ± 7,51%	<b>0,004**</b>						
PPA (%)	87,60 ± 4,37%	60,91 ± 10,89%	<b>0,004**</b>	79,93 ± 6,07%	62,03 ± 7,38%	<b>0,004**</b>	77,87 ± 7,38%	51,68 ± 12,95%	<b>0,016**</b>
PPA global (%)	74,25 ± 4,62%			70,98 ± 3,27%			64,77 ± 4,94%		<b>0,047*</b>
Vasos sanos/campo (media)				2,83 ± 0,73	1,73 ± 0,61	<b>0,045*</b>	2,20 ± 0,68	1,53 ± 0,78	0,142
Vasos patológicos/campo (media)				0,56 ± 0,26	1,46 ± 0,39	<b>0,007**</b>	0,70 ± 0,35	1,70 ± 0,20	<b>0,004**</b>
Vasos sanos/campo (media)				2,83 ± 0,73			2,20 ± 0,68		0,683
Vasos patológicos/campo (media)				0,56 ± 0,26			0,70 ± 0,35		0,197
Vasos sanos/campo (media)					1,73 ± 0,61			1,53 ± 0,78	0,115
Vasos patológicos/campo (media)					1,46 ± 0,39			1,70 ± 0,20	0,257

**Tabla 4. Resultados detallados (media ± desviación estándar) de las distintas variables de la VCA.**  
TI: trasplante inmediato; IF: isquemia fría.



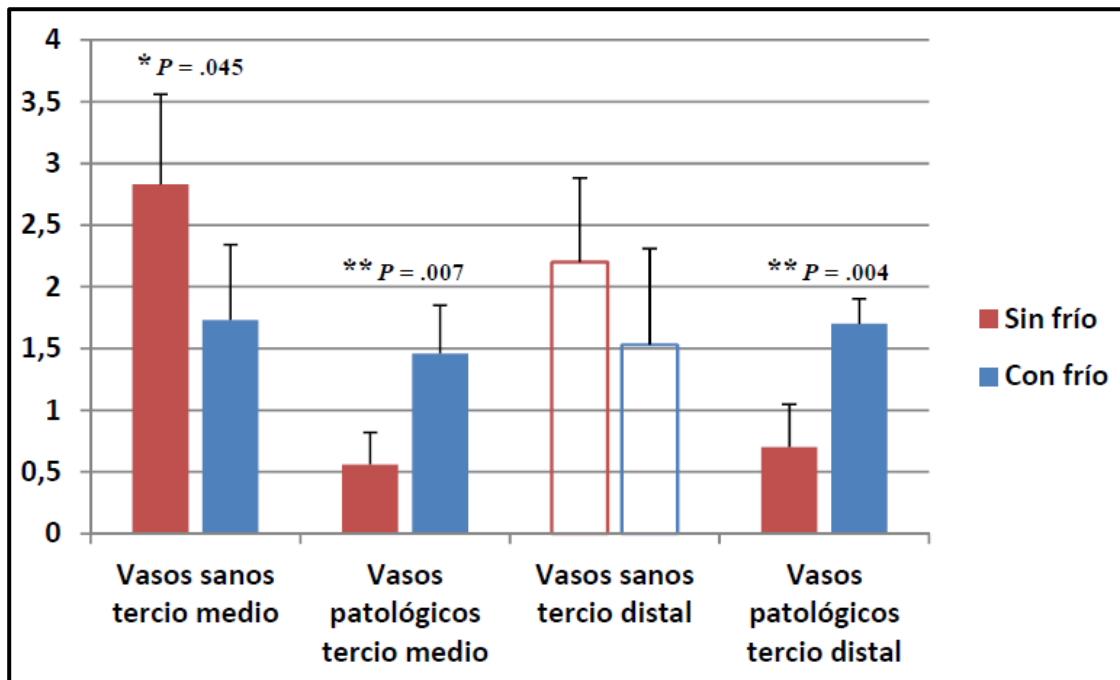
**Figura 17. VCA en vasos femorales.** *Superior* ( $\times 200$ ): vasos femorales con mínima VCA, tinción de orceína nítrica, detalle de las mediciones de la PI y el PPA. *Inferior* ( $\times 200$ ): vasos femorales con intensa VCA, tinción de orceína nítrica, detalle de las mismas mediciones.



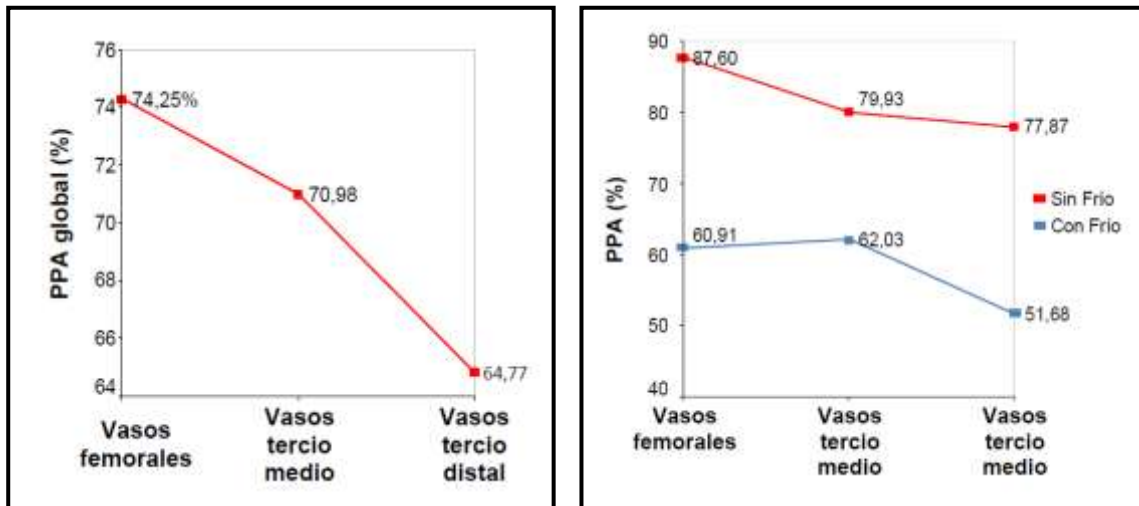
**Figura 18.** Representación en boxplot de las comparaciones entre las variables de la VCA. *Superior:* PI a nivel de los vasos femorales. *Medio:* PPA a nivel de los vasos femorales. *Inferior:* PPA de los vasos de pequeño y mediano calibre a nivel del tercio medio y distal de los aloinjertos.

Considerando el PPA global de todos los niveles, se calculó una media de PPA en los vasos femorales del 74,25% ( $\pm 4,62\%$ ), en los vasos del tercio medio del aloinjerto del 70,98% ( $\pm 3,27\%$ ), y en los del tercio distal del 64,77% ( $\pm 4,94\%$ ). Las diferencias entre los niveles fueron significativas ( $P = 0,047$ ) (ver

*Tabla 4*) y están representadas en la *Figura 20 izquierda*. Se exploró de manera apareada los niveles, y se encontraron diferencias significativas con la suficiente potencia entre los vasos femorales y los vasos de pequeño y mediano calibre del tercio distal, con una diferencia media del PPA del 9,47% ( $\pm 2,93\%$ ),  $P = 0,024$ . Si consideramos de manera independiente el PPA, teniendo en cuenta los distintos grupos experimentales, se observó la misma tendencia observada en el PPA global con una significación estadística de  $P = 0,0001$ . Resultados representados en la *Figura 20, derecha*. Al realizar la comparación apareada teniendo en cuenta el grupo de preservación al que pertenecen, se mantuvo la diferencia ( $P = 0,035$ ) entre el PPA de los vasos femorales y el de los vasos de pequeño y mediano calibre a nivel del tercio distal, con una diferencia media del PPA entre ambos de 9,47% ( $\pm 3,07\%$ ).



**Figura 19.** Representación en diagrama de barras de la media del número de vasos sanos y patológicos por campo en el tercio medio y distal de los aloinjertos.



**Figura 20.** Comparación del PPA entre los distintos niveles muestreados. *Izquierda:* de manera global. *Derecha:* de manera independiente, separando los resultados según el grupo de experimentación al que pertenecen.

#### **4.2.2 Resultados de la fibrosis.**

La intensidad de la fibrosis observada en las muestras, y recogida de forma semicuantitativa, se encuentra detallada en la *Tabla 5*. En la *Figura 21* está representada mediante un diagrama de barras la media de los valores recogidos.

#### **4.2.3 Resultados del infiltrado leucocitario.**

##### **4.2.3.1 Cuantitativos.**

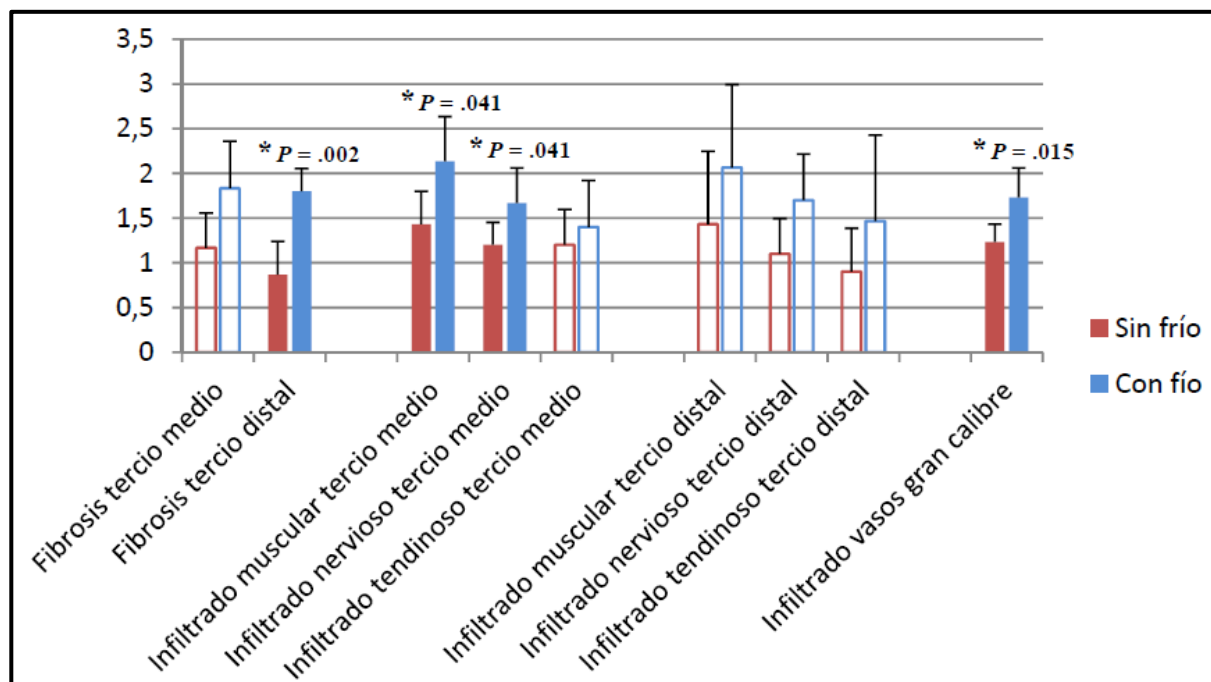
La valoración semicuantitativa del infiltrado leucocitario a nivel muscular, nervioso y tendinoso, en las muestras del tercio medio y del tercio distal de los aloinjertos, así como del infiltrado leucocitario perivascular entorno a los vasos femorales, se encuentra detallada en la *Tabla 5*. En la *Figura 21* está la representación gráfica de las medias mediante un diagrama de barras.

##### **4.2.3.2 Cualitativos.**

Las medias de los contajes de células por campo microscópico ( $\times 200$ ) para los estudios IHQ con los antígenos CD3, CD4, CD8, CD20 y CD68, se encuentran detalladas en la *Tabla 6*. Las representaciones en boxplot de las comparaciones entre las medias, se encuentra en la *Figura 22* y la *Figura 23*.

VARIABLES	Tercio medio del aloinjerto		P	Tercio distal del aloinjerto		P
	TI	IF		TI	IF	
Fibrosis (0 - 3)	1,16 ± 0,38	1,83 ± 0,52	0,093	0,86 ± 0,37	1,86 ± 0,25	<b>0,002**</b>
Infiltrado leucocitario muscular (0 - 4)	1,43 ± 0,36	2,13 ± 0,50	<b>0,041*</b>	1,43 ± 0,81	2,06 ± 0,92	0,132
Infiltrado leucocitario nervioso (0 - 4)	1,20 ± 0,25	1,66 ± 0,39	<b>0,041*</b>	1,10 ± 0,39	1,70 ± 0,51	0,093
Infiltrado leucocitario tendinoso (0 - 4)	1,20 ± 0,40	1,40 ± 0,52	0,310	0,90 ± 0,48	1,46 ± 0,96	0,589
	Trasplante inmediato			Isquemia fría		P
Infiltrado leucocitario perivascular en vasos femorales (0 - 4)	1,23 ± 0,19			1,73 ± 0,32		<b>0,015*</b>

**Tabla 5. Resultados detallados (media ± desviación estándar) de las mediciones semicuantitativas para la valoración de la fibrosis y del infiltrado leucocitario, a nivel del tercio medio, distal y de los vasos femorales. TI: trasplante inmediato; IF: isquemia fría.**



**Figura 21. Comparación de la media de fibrosis e infiltrado leucocitario a nivel del tercio medio muscular, el tercio distal y los vasos de gran calibre.**

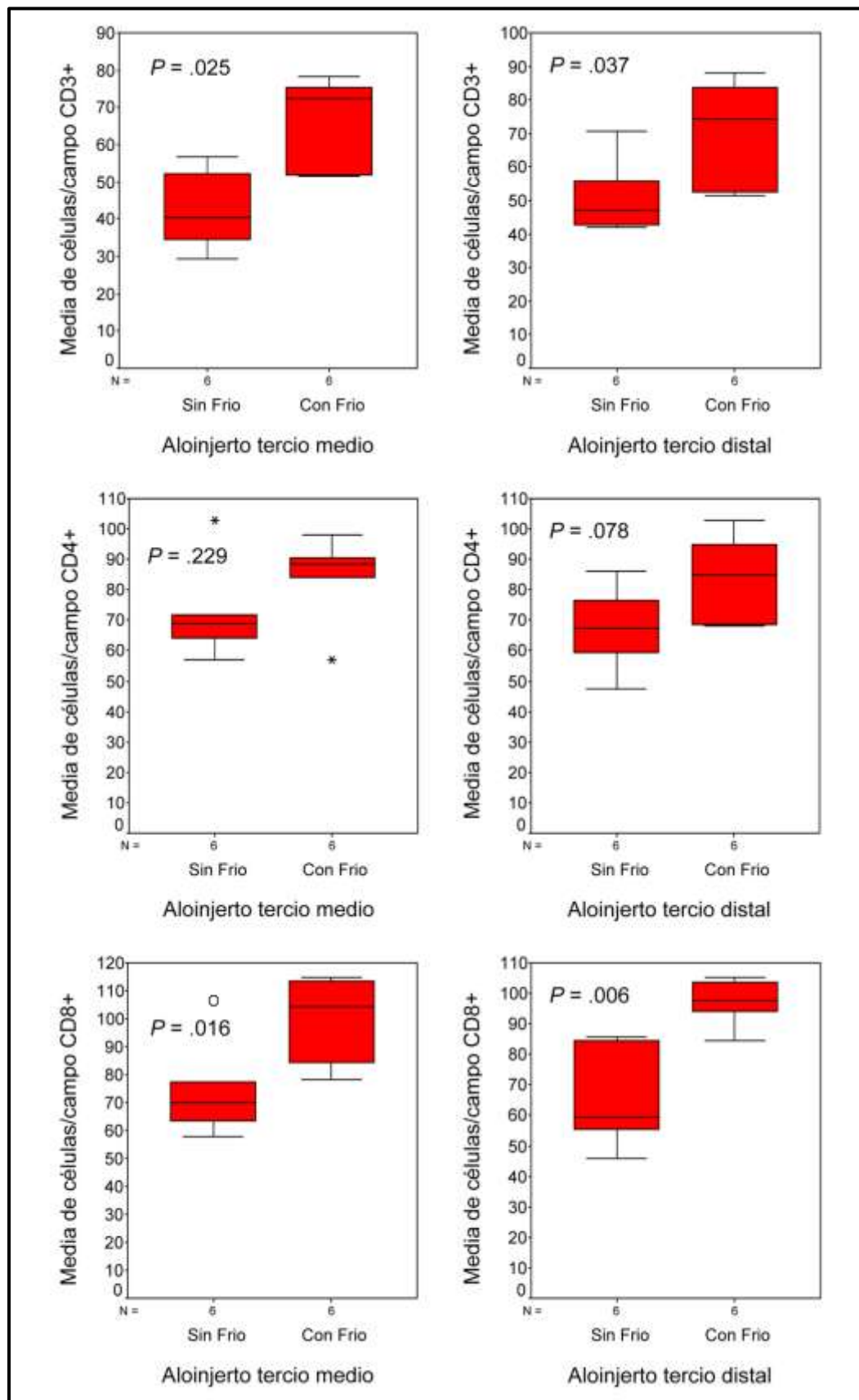


#### 4.2.4 Resultados de la valoración del rechazo humoral.

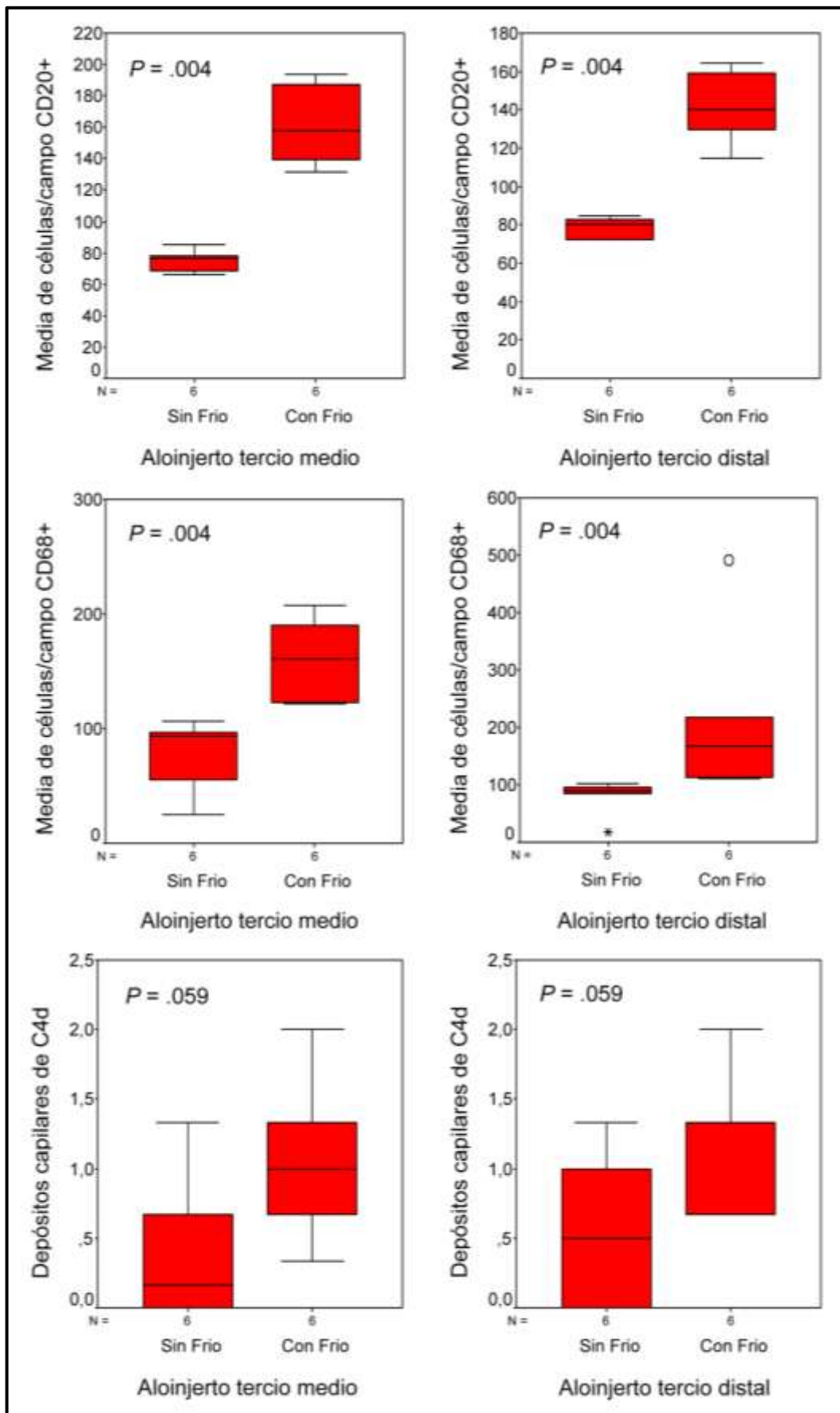
Las medias de los depósitos intravasculares de C4d por campo microscópico ( $\times 200$ ), según la clasificación Banff del 2007 para patología de aloinjertos renales<sup>128,346</sup>, se encuentra detallada en la *Tabla 6*<sup>131,349131,349131,349131,349</sup>. En la *Figura 23* está la representación en boxplot de la comparación entre las medias.

VARIABLES	Tercio medio del aloinjerto		P	Tercio distal del aloinjerto		P
	TI	IF		TI	IF	
Células T CD3 <sup>+</sup> /campo (media)	42,28 $\pm$ 10,71	67,00 $\pm$ 11,97	<b>0,025*</b>	50,83 $\pm$ 10,89	70,67 $\pm$ 15,92	<b>0,037*</b>
Células T CD4 <sup>+</sup> /campo (media)	72,17 $\pm$ 15,85	84,50 $\pm$ 14,26	0,229	67,39 $\pm$ 13,81	84,00 $\pm$ 14,40	0,078
Células T CD8 <sup>+</sup> /campo (media)	74,28 $\pm$ 17,21	99,89 $\pm$ 16,03	<b>0,016*</b>	65,00 $\pm$ 16,32	97,11 $\pm$ 7,44	<b>0,006**</b>
Células B CD20 <sup>+</sup> /campo (media)	75,33 $\pm$ 7,00	78,72 $\pm$ 5,34	<b>0,004**</b>	161,28 $\pm$ 25,95	141,56 $\pm$ 19,01	<b>0,004**</b>
Células CD68 <sup>+</sup> /campo (media)	78,28 $\pm$ 31,19	160,67 $\pm$ 35,26	<b>0,004**</b>	79,61 $\pm$ 31,67	210,89 $\pm$ 144,68	<b>0,004**</b>
Depósitos C4d/campo (media)	0,39 $\pm$ 0,53	1,05 $\pm$ 0,61	0,059	0,56 $\pm$ 0,54	1,22 $\pm$ 0,50	0,059

**Tabla 6.** Resultados detallados (media  $\pm$  desviación estándar) de los contajes celulares para los estudios IHQ con los antígenos CD3, CD4, CD8, CD20 y CD68, y de los depósitos intravasculares de C4d, a nivel del tercio medio y distal del aloinjerto. TI: trasplante inmediato; IF: isquemia fría.



**Figura 22.** Representación en boxplot de las comparaciones entre las medias de los contejes celulares/campo (x200) para IHQ CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Superior: CD3<sup>+</sup> a nivel de los tercios medio y distal del aloinjerto. Medio: CD4<sup>+</sup> a nivel de los tercios medio y distal del aloinjerto. Inferior: CD8<sup>+</sup> a nivel de los tercios medio y distal del aloinjerto.



**Figura 23.** Representación en boxplot de las comparaciones entre las medias de los contejes celulares/campo ( $\times 200$ ) para IHQ CD20<sup>+</sup> y CD68<sup>+</sup>, y para los depósitos capilares de C4d. *Superior:* CD20<sup>+</sup> a nivel de los tercios medio y distal del aloinjerto. *Medio:* CD68<sup>+</sup> a nivel de los tercios medio y distal del aloinjerto. *Inferior:* C4d a nivel de los tercios medio y distal del aloinjerto.



### 4.3 RESULTADOS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS CITOQUINAS.

Los niveles tisulares del TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10, medidos por Q-PCR en tiempo real, a nivel de las muestras musculares del tercio medio y distal de los aloinjertos, se encuentran detalladas en la *Tabla 7*.

VARIABLES	Tercio medio del aloinjerto		<i>P</i>	Tercio distal del aloinjerto		<i>P</i>
	TI	IF		TI	IF	
<b>TNF-<math>\alpha</math></b> <b>(media)</b>	0,000483 $\pm$ 0,000224	0,000322 $\pm$ 0,000266	0,150	0,001552 $\pm$ 0,002431	0,000391 $\pm$ 0,000410	0,522
<b>IL-6</b> <b>(media)</b>	0,088381 $\pm$ 0,223184	0,077337 $\pm$ 0,038584	1,000	0,117853 $\pm$ 0,049470	0,126270 $\pm$ 0,094142	0,936
<b>IL-10</b> <b>(media)</b>	0,090856 $\pm$ 0,047448	0,047180 $\pm$ 0,027216	0,150	0,087359 $\pm$ 0,074010	0,088089 $\pm$ 0,077417	0,873

**Tabla 7.** Resultados detallados (media  $\pm$  desviación estándar) de los niveles tisulares de las distintas citoquinas, a nivel del tercio medio y distal del aloinjerto. TI: trasplante inmediato; IF: isquemia fría.



## **5 DISCUSIÓN.**





Este estudio muestra un modelo de trasplante de pata posterior en rata en posición heterotópica a nivel inguinal tras 7 horas de isquemia fría. Este modelo logra provocar la VCA en los animales de experimentación y permite verificar el principal objetivo de este trabajo, que la isquemia fría es un factor inductor de la VCA en los tejidos del TTC. Los parámetros empleados para valorar la intensidad de la VCA (PI, PPA, número de vasos afectados por campo) se han alterado de forma significativa en el grupo de aloinjertos sometidos a isquemia fría. Por tanto hay que tener en cuenta la importancia del frío como factor inductor de la VCA, una patología que en el momento actual carece de un tratamiento eficaz y es causa de pérdida tardía del aloinjerto.

El modelo experimental es un modelo microquirúrgico con una mortalidad que alcanza el 60% de incidencia. La realización de dos trasplantes seguidos con un total de cuatro anastomosis microquirúrgicas, y la necesidad de que los animales sobrevivieran posteriormente durante 2 meses, son rasgos técnicos a tener en cuenta. La ejecución de dos trasplantes seguidos empleando como donante un mismo animal responde a varios aspectos. El primero disminuir el número de animales de experimentación empleados, ya que en EEUU se emplean anualmente entre 17 y 23 millones de animales de laboratorio (95% ratas y ratones)<sup>350</sup>. Sólo en el año 2000, en EEUU se emplearon más de 69.516 perros y 25.560 gatos de experimentación<sup>351</sup>. Segundo, disminuir el número de animales de experimentación también disminuye la necesidad de espacio para estabularlos y el coste económico global del trabajo. Y tercero, disminuimos la variabilidad inmunológica entre los trasplantes aumentando así la homogeneidad intergrupal<sup>347</sup>. De manera estadísticamente significativa ( $P = 0,033$ ) los animales intervenidos en primer lugar se asignaron principalmente al grupo de trasplante inmediato (62,5%), y los operados en segundo lugar fueron en su mayoría sometidos al trasplante tras las 7 horas de isquemia fría (88,9%), el número de orden de intervención

no se asoció con la presencia de más complicaciones intraoperatorias ni afectó a la supervivencia de los animales ( $P = 0,411$  en ambos casos). Se realizó un posterior análisis estratificado para comprobar que el número de orden no se comportase como un posible factor de confusión respecto a estos parámetros, y los resultados no fueron significativos para ninguna de las dos posiciones. Esto indica que a pesar de realizar dos microcirugías en un mismo día, no es un factor a tener en cuenta para la realización del trabajo.

Los tiempos medios de intervención (164 minutos) y de microsutura (106 minutos) se deben a la curva de aprendizaje del modelo experimental. Esto no se comporta como un factor de confusión, ya que se distribuye homogéneamente entre ambos grupos a lo largo de la realización del modelo. Cabe destacar que se identificó una tendencia entre un menor tiempo de microcirugía y por tanto de intervención quirúrgica, y una mayor supervivencia de los animales, pero sin llegar a la significación estadística ( $P = 0,075$ ). Un mayor tiempo de intervención se asocia a una mayor pérdida de fluidos, al establecimiento del vasoespasmo e hipotermia por exposición y por tanto a un peor pronóstico de la cirugía<sup>352</sup>.

La preservación del aloinjerto en isquemia fría a 4°C se debe a que ésta es la temperatura estándar de preservación de los aloinjertos cardíacos (0-4°C). Salvando las diferencias entre los cardiomiocitos y los rhabdomiocitos, el aloinjerto cardíaco es el único TOS que posee un componente muscular mayoritario, al igual que nuestro modelo experimental, donde el aloinjerto desepidermizado de pata posterior de rata presenta un componente mayoritario de músculo esquelético. La elección del tiempo de isquemia se basa en estudios previos en TOS y en colgajos alogénicos. Los tiempos de isquemia fría en modelos experimentales de trasplante cardíaco y VCA oscilan entre los 30 minutos y las 10 horas<sup>204,211,266</sup>. Modelos de trasplante renal que también trabajan con isquemia

fría como posible inductor de respuestas inmunitarias, someten el órgano trasplantado a 16 horas de isquemia fría<sup>353</sup>. En un trabajo sobre alocolgajos inguinales trasplantados a distintos tiempos de isquemia fría (0, 6, 12, 18 y 24 horas), detectaron que pasadas las 18 horas de preservación en frío se veía comprometida la supervivencia del colgajo<sup>354</sup>. Realizar el trasplante tras someter al aloinjerto a 10-12 horas de isquemia fría no se corresponde con la práctica clínica, donde no se dan tiempos de preservación fría tan largos. Siete horas de isquemia fría es un tiempo de preservación elevado pero real, que favorece el desarrollo de la VCA<sup>211</sup>. La preservación del aloinjerto en isquemia fría durante 7 horas no afectó a la supervivencia de los animales, tanto evaluando el frío como un factor independiente ( $P = 0,695$ ) como cuando se realizó un análisis estratificado para intentar controlar posibles factores de confusión ( $P = 0,333$ ). Esto se corresponde con los conocimientos actuales sobre los macrorreimplantes y sus tiempos de isquemia<sup>355-357</sup>. En nuestro modelo experimental el único factor asociado de manera significativa ( $P = 0,047$ ) a la supervivencia de los animales fue la presencia de complicaciones intraoperatorias, que se asoció a una menor supervivencia de los mismos (30,8%). La presencia complicaciones intraoperatorias no se asoció al grupo sometido al trasplante con isquemia fría ( $P = 0,695$ ), sino que se distribuyó entre ambos grupos de experimentación.

La presencia de signos de RC, tanto en el 93,33% de las femorales de los aloinjertos trasplantados de manera inmediata como en el 100% de las femorales del grupo de isquemia fría (ver *Tabla 4*), está en relación al modelo experimental empleado. En TOS se ha demostrado la importancia del RA como factor inductor de la VCA, asociándose a una mayor incidencia de vasculopatía y a una menor tasa de supervivencia de los aloinjertos<sup>206,207</sup>. Nuestro modelo experimental se basa en la presencia de episodios de RA leve-moderados, al estar ambos grupos sometidos a un

potente inductor de la VCA y bajo inmunosupresión subóptima, para poder alcanzar un desarrollo temprano del RC<sup>203</sup>. A pesar de esto, hay descritos otros modelos de VCA con trasplante heterotópico de órgano sólido y piel entre ratas Fisher (cepa F344) y LBN<sup>358</sup>. Al igual que en los aloinjertos cardiacos, donde la VCA afecta a las arterias coronarias en toda su longitud desde la base del corazón hasta el ápex<sup>277</sup>, la VCA también se aprecia en las muestras de tejido muscular de los aloinjertos afectando a los vasos de pequeño y mediano calibre (<120µm). La VCA está presente en ambos grupos (sin frío y con frío), pero existe una mayor afectación en el grupo sometido a las 7 horas de ischemia a 4°C, tanto en el tercio medio (6,66% vs 66,66%,  $P = 0,004$ ) como en el tercio distal (20% vs 76,66%,  $P = 0,004$ ).

En los parámetros que valoran específicamente el RC a nivel histológico encontramos valores alterados de manera significativa en el grupo sometido a preservación en frío. La media de PI calculada en los vasos de gran calibre (>120µm) del aloinjerto presenta diferencias significativas ( $P = 0,004$ ) cuando se compara el grupo del trasplante inmediato con el grupo de ischemia fría durante 7 horas (16,13% y 52,44% respectivamente). Igualmente, el PPA de los vasos femorales también refleja de manera significativa ( $P = 0,004$ ) la hiperplasia intimal, con una permeabilidad de la luz vascular del 87,60% en los aloinjertos trasplantados de manera inmediata frente a un 60,91% de permeabilidad en aquellos sometidos a la preservación a 4°C (ver *Figura 17*). En el segmento de arteria femoral perteneciente al animal receptor, las diferencias entre los valores de PI y PPA de ambos grupos experimentales no fueron significativas ( $P = 0,262$  y  $P = 0,337$  respectivamente). Esto indica que la vasculopatía queda limitada a los vasos del aloinjerto, siguiendo la historia natural de la enfermedad donde sólo se afectan los vasos del órgano trasplantado<sup>205</sup>. El grupo sometido a ischemia durante 7 horas a 4°C presenta de manera significativa una estenosis de la luz vascular secundaria

a la hiperplasia intimal, que se manifiesta con un importante descenso del PPA y una elevada PI a nivel histológico. Esto supone una disminución del flujo vascular y una pérdida tardía del órgano trasplantado en TOS, secundaria a la isquemia y fibrosis del parénquima. Al centrarnos en los datos de permeabilidad arterial obtenidos en ambos tercios musculares para vasos de mediano y pequeño calibre ( $<120\mu\text{m}$ ), éstos también siguen la línea de la hipótesis del trabajo. Las diferencias en el PPA a nivel del tercio medio muscular fueron significativas ( $P = 0,004$ ) entre el grupo de trasplante inmediato y el grupo de preservación en frío (79,93% y 62,03% respectivamente). Los mismos resultados se repiten a nivel del tercio distal ( $P = 0,016$ ), con una permeabilidad del 77,87% en el grupo sin frío y del 51,68% en el grupo de isquemia a  $4^{\circ}\text{C}$  (ver *Figura 18*). Estos datos también demuestran lo comentado anteriormente, y es que la VCA se distribuye a lo largo de todo el árbol vascular del aloinjerto afectando tanto a los grandes vasos como a las arteriolas, confirmando la distribución difusa de la VCA<sup>280</sup>. Sin embargo se necesitan más estudios para comprobar si la distribución de la hiperplasia intimal ocurre de manera continua y longitudinal a lo largo de todo el eje vascular, o de manera contraria, se distribuye de manera parcheada. Estas diferencias histológicas podrían ser importantes cara a un hipotético tratamiento quirúrgico de las lesiones, ya que la focalidad de las mismas facilitaría su tratamiento percutáneo; a pesar de que la incidencia de recidiva es alta (55%) cuando estos procedimientos se realizan ante la presencia de una VCA focal y segmentaria en los pacientes trasplantados cardiacos<sup>338,359</sup>.

Para poder calcular las diferencias en intensidad de la VCA a los distintos niveles, se realizó el análisis global del PPA. Éste indicó de manera significativa ( $P = 0,047$ ) que hay una menor permeabilidad de la luz vascular a medida que nos desplazamos a los segmentos vasculares más distales. A continuación se analizó esta tendencia de manera

pareada entre los segmentos, para poder comprobar si había diferencias directamente entre dos segmentos consecutivos, o por el contrario, éstas sólo se detectaban cuando se comparaban los dos extremos más opuestos. Se encontraron diferencias ( $P = 0,024$ ) sólo entre los segmentos más proximales (vasos femorales, PPA 74,25%) y los más distales (vasos en tercio muscular distal, PPA 64,77%). También se analizaron de manera separada los datos de permeabilidad de la luz vascular de los dos grupos experimentales, para descartar que la disminución del PPA observado no se debiera sólo al grupo de la preservación en frío. Se encontraron las mismas diferencias al realizar este análisis en ambos grupos por separado, tanto en el grupo de trasplante inmediato como en el grupo sometido a las 7 horas de isquemia fría, que presentaron un menor PPA de manera significativa ( $P = 0,0001$ ) a medida que las muestras eran más distales (ver *Figura 20*). El análisis apareado por segmentos también se repitió por separado, teniendo en cuenta el grupo experimental al que pertenecían las muestras, y volvió a confirmar el mismo dato obtenido con el PPA global. Las diferencias sólo se observaron de manera apareada entre el segmento vascular más proximal estudiado y el más distal, entre los vasos femorales y el tercio distal ( $P = 0,035$ ). De todo esto se puede deducir que la permeabilidad de la luz arterial, tanto de manera global como por grupos, disminuye a medida que nos desplazamos distalmente en el árbol vascular. Esto refleja una mayor hiperplasia intimal, y por tanto una mayor intensidad de la VCA en los segmentos distales. Mundinger describió en monos (*Macaca fascicularis*) que la VCA afectaba a los grandes árboles vasculares de TTCs oromandibulares (accesibles por BMU) y también a los vasos de pequeño y mediano calibre (sólo valorables con una biopsia tisular)<sup>293</sup>. Una mayor afectación distal podría ser una manera de realizar biopsias de forma dirigida a la zona más afecta, antes de que se afectasen los vasos principales del aloinjerto. Se requiere de estudios adicionales que valoren si la aparición de la VCA es

sincrónica en todo el árbol vascular, o por el contrario se desarrolla de distal a proximal. También es necesario un análisis histológico más detallado, para poder concretar si las diferencias estructurales entre las arterias de gran calibre ( $>120\mu\text{m}$ ) y las de pequeño y mediano calibre ( $<120\mu\text{m}$ ) tienen alguna relación con este efecto. La VCA se produce, entre otros factores, por una migración de los leiomiocitos de la media a la íntima y a un aumento de la producción de matriz extracelular por los mismos. Las arterias de mayor calibre, con una mayor cantidad de leiomiocitos en su túnica media, podrían ser las que expresasen con mayor intensidad la hiperplasia intimal propia de la enfermedad. A la vista de los resultados del modelo experimental, esta hipótesis parece no ser cierta y requiere de un estudio en mayor profundidad.

Se detectó un mayor número de vasos patológicos por campo en el grupo de preservación en frío en ambos tercios musculares, medio y distal (1,46 y 1,70 respectivamente), frente al grupo de trasplante inmediato (0,56 y 0,70), y en ambos casos los resultados fueron significativos ( $P = 0,007$  y  $P = 0,004$  respectivamente). El mayor número de vasos sanos por campo sólo fue significativo en el tercio medio para el grupo de trasplante inmediato (2,83;  $P = 0,045$ ), pero no en el tercio distal (ver los resultados en la *Figura 19*). Estos datos se engloban dentro de la línea de la hipótesis del estudio, donde se puede observar una relación frío-dependiente en cuanto a la mayor presencia de la VCA en los aloinjertos. Se encontraron más vasos con VCA en el grupo II, y más vasos sanos en el grupo I, aunque esto último sólo de manera significativa en el tercio medio. El incremento de intensidad de la VCA con la progresión distal, ya comentada anteriormente al valorar el PPA, no se encontró en este caso ni para el tercio medio ( $P = 0,197$ ) ni para el tercio distal ( $P = 0,257$ ). También se analizó esta relación con el número de vasos sanos observados por campo, para poder comprobar que los datos se mantenían de manera coherente en todo el estudio, no encontrándose ningún

tipo de asociación significativa. Analizados de forma conjunta, todos estos datos verifican que la isquemia fría se comporta como un factor inductor de la VCA dentro de este modelo de TTC experimental, tal y como ya se ha comprobado en TOS y aún no se ha demostrado en los TTCs<sup>266,360</sup>.

La fibrosis muscular presente en casi el 100% de las muestras estudiadas puede tener diversas causas. Tanto el daño por la manipulación tisular durante la intervención quirúrgica, como la isquemia peritrasplante, el daño por reperfusión del aloinjerto o el daño inmunitario directo son posibles factores relacionados con la fibrosis muscular observada. En este estudio, los aloinjertos trasplantados no fueron reinervados para controlar los posibles factores de confusión a la hora de realizar el análisis. Sin embargo, esto dificulta la extrapolación a otros estudios (menor validez externa) de la valoración de los resultados de la fibrosis muscular, aunque la disminución del error sistemático al mejorar el control sobre los factores de confusión permitió un análisis estadístico más riguroso de los resultados. Se observó una mayor fibrosis en los aloinjertos sometidos a las 7 horas de preservación en frío comparados con los trasplantados de manera inmediata de manera estadísticamente significativa en el tercio distal ( $P = 0,002$ ), y con una tendencia pero sin llegar a ser significativo ( $P = 0,093$ ) en el tercio medio (ver *Tabla 5* y *Figura 21*). Los resultados indican que hay una mayor lesión muscular en el grupo sometido a la isquemia fría de 7 horas, sin embargo queda por aclarar si esta fibrosis está en relación con la reacción inflamatoria asociada a los episodios de RA, es una consecuencia de la VCA de los vasos de pequeño y mediano calibre, o se debe a alguno de los otros factores antes mencionados. En nuestro estudio la fibrosis no se limitó a la región perivascular, sino que presentó una distribución homogénea en la masa muscular de cada tercio. Esta distribución homogénea de la fibrosis ya fue observada por Armstrong en un trabajo sobre trasplante cardiaco en ratas,



y apoya la hipótesis de que la causa está en la disminución del flujo sanguíneo debido a la VCA<sup>361</sup>. Sin embargo en este mismo trabajo se especula con que la fibrosis intersticial de los aloinjertos y el desarrollo de la VCA son fenómenos independientes aunque paralelos al proceso de rechazo del aloinjerto. Adicionalmente, en los TTCs no está claro hasta qué punto la fibrosis del aloinjerto compromete la función del órgano trasplantado, como sí ocurre en los TOS<sup>362,363</sup>.

La mayor parte de los datos histológicos de los TTCs se refieren a las biopsias cutáneas<sup>46</sup>. Sin embargo nuestro modelo experimental evita la valoración del rechazo a nivel cutáneo, ya que los episodios repetidos de RA provocaban ulceraciones cutáneas que suponían un problema ético. Se modificó el modelo y se decidió enterrar de manera completa el aloinjerto a nivel inguinal, prescindiendo del componente cutáneo. La valoración del infiltrado leucocitario se realizó por tanto sólo en los tejidos profundos.

A nivel del tercio medio las diferencias entre el grupo de trasplante inmediato y el grupo de isquemia fría fueron significativas para el componente muscular y nervioso ( $P = 0,041$  en ambos casos), pero estas diferencias no se detectaron a nivel del tercio distal ( $P = 0,132$  y  $P = 0,093$  respectivamente). El infiltrado leucocitario a nivel del tejido tendinoso entre los grupos no fue significativo en ninguno de los tercios (ver *Tabla 5* y *Figura 15*). Las diferencias en el infiltrado perivascular a nivel de los vasos femorales de los aloinjertos fueron significativas ( $P = 0,015$ ) cuando se comparó el grupo de trasplante inmediato frente al de isquemia fría de 7 horas. Cabe destacar que en todas las muestras tisulares se encontró un mayor infiltrado leucocitario en el grupo sometido a la preservación a 4°C. El efecto de la VCA en los componentes de un TTC sigue sin estar claro, pero nuestros hallazgos indican que sería recomendable monitorizar los aloinjertos con biopsias tanto cutáneas como profundas, como ya se ha descrito<sup>364</sup>.

Durante los episodios de rechazo los linfocitos T y los macrófagos rodean los vasos del aloinjerto y producen una vasculitis, a semejanza del infiltrado parenquimatoso en el TOS, que se conoce como “rodete perivascular”. El reconocimiento de los antígenos de las células endoteliales del donante en forma de CMH tipo II por parte de los linfocitos T circulantes supone el inicio de la respuesta celular contra el aloinjerto<sup>365</sup>. Los contejes por campo de las células CD3<sup>+</sup> presentaron diferencias estadísticamente significativas al comparar ambos grupos de experimentación tanto en el tercio medio como en el tercio distal ( $P = 0,025$  y  $P = 0,037$  respectivamente) (ver *Figura 22 superior*). Esto concuerda con los conocimientos sobre la etiopatogenia del RC, donde la respuesta observada es fundamentalmente celular y a expensas de linfocitos T y macrófagos<sup>205</sup>. Mundinger en su reciente estudio sobre RC en un modelo de TTCs faciales en primates presentó hallazgos histopatológicos parecidos con un predominio de infiltrados CD3<sup>+</sup> en las biopsias tisulares profundas<sup>293</sup>. La mayor intensidad de la VCA observada en el grupo sometido a la isquemia fría concuerda con una mayor celularidad CD3<sup>+</sup> en este mismo grupo, ya que son células directamente implicadas en la génesis de este rechazo.

En este estudio, los contejes por campo de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en las muestras de ambos tercios musculares no presentaron diferencias significativas entre los dos grupos de experimentación ( $P = 0,229$  y  $P = 0,037$ , para el tercio medio y distal respectivamente) (ver *Figura 22 medio*). En ambos tercios el grupo sometido a la preservación en frío presentó mayores contejes por campo de células CD4<sup>+</sup>. Aunque los linfocitos T “helper” son los principales efectores del rechazo, una vez establecido éste contribuyen otras muchas estirpes celulares en el mantenimiento del mismo. Mosmann ha demostrado que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> crónicamente activados evolucionan a una subclase y son capaces de secretar de manera exclusiva un sólo tipo de citoquina<sup>366</sup>. Es probable que el infiltrado inflamatorio CD4<sup>+</sup> crónicamente activado del RC quede

relativamente estabilizado y que no sea accesible a demostrar diferencias entre ambos grupos de experimentación al estar presente el RC en ambos, aunque sea en distintos grados de intensidad, y la población  $CD4^+$  ser más o menos estable en cuanto a su número.

En las biopsias musculares estudiadas se objetivó un importante infiltrado inflamatorio  $CD8^+$  tanto en el grupo de trasplante inmediato como en el grupo sometido a la preservación en frío. Los  $CD8^+$  alorreactivos están directamente implicados en el daño tisular que se produce durante el rechazo de un aloinjerto, al ser de las primeras células que interaccionan con los antígenos en forma de CMH tipo I de las células endoteliales del aloinjerto, produciendo una citólisis dirigida. Las diferencias entre ambos grupos de experimentación fueron estadísticamente significativa para ambos tercios musculares ( $P = 0,016$  y  $P = 0,006$ , para el tercio medio y distal respectivamente) (ver *Figura 22 inferior*). Estos datos son congruentes con todo lo observado. La mayor intensidad de la VCA que se aprecia de manera significativa en el grupo sometido a la isquemia fría, se relaciona directamente con un mayor infiltrado citotóxico (también de manera significativa) y por tanto con una mayor lesión tisular y fibrosis, tal y como se ha comentado. Si los  $CD8^+$  son una de las estirpes celulares directamente implicadas en el rechazo celular mediado por los linfocitos T  $CD4^+$ , es lógico encontrar un denso infiltrado inflamatorio citotóxico en las muestras que han sido sometidas a factores inductores de la VCA. Esta reacción citotóxica  $CD8^+$  alorreactiva sólo la pueden desencadenar las CPAs del donante, ya que las CPAs de receptor carecen de estos aloantígenos en forma de CMH tipo I. Strehlau realizó un estudio clínico con 60 biopsias renales de 34 pacientes trasplantados, identificando al linfocito T  $CD8^+$  como uno de los responsables del RA parenquimatoso, detectando la expresión génica de éste previo a las manifestaciones clínicamente detectables de un

episodio de rechazo y empleándolo como un marcador precoz de RA<sup>367</sup>. Una de las explicaciones de este fenómeno es que los inmunosupresores actuales, y especialmente los ICN como la CsA y el Tac, inhiben de forma más eficaz a las células T CD4<sup>+</sup> que a los linfocitos T efectores CD8<sup>+</sup>. Esa mayor inhibición de la respuesta T CD4<sup>+</sup> podría explicar la dificultad para demostrar diferencias en los infiltrados entre los distintos grupos de experimentación; mientras que la menor inhibición de la actividad citotóxica T CD8<sup>+</sup> explicaría la alta precisión en el resultado de las diferencias entre los infiltrados CD8<sup>+</sup> de ambos grupos (ver *Tabla 6*).

Los macrófagos activados CD68<sup>+</sup> son los efectores mejor caracterizados dentro de las reacciones inmunitarias CD4<sup>+</sup>. La manifestación más característica de su respuesta es su infiltrado perivascular y tisular, así como fenómenos inflamatorios y de trombosis vascular. Podrán además exacerbar la isquemia tisular ya presente debido a la disminución de flujo sanguíneo por la hiperplasia intimal<sup>138</sup>. Cuando esta reacción se mantiene de manera indefinida, la liberación de citoquinas y factores de crecimiento por parte de los macrófagos actúa sobre las células mesenquimales estimulando la secreción de matriz extracelular, la fibrosis tisular y desencadenando el RC<sup>288</sup>. En un estudio de Kitchens sobre trasplante cardíaco en ratones, se evitó el desarrollo de la VCA en los aloinjertos provocando una depleción macrofágica pero no suprimiendo su capacidad fagocítica, sugiriendo que los macrófagos inducen la VCA mediante la liberación de citoquinas proinflamatorias y factores tróficos, y no por sus funciones fagocíticas<sup>368</sup>. En las biopsias de nuestro estudio se encontraron numerosos infiltrados macrofágicos en ambos grupos de experimentación con contajes que excedían las 200 células por campo, lo que destaca su papel en el mantenimiento de la respuesta inflamatoria y el daño tisular asociado al RC. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas, tanto en el tejido muscular del tercio medio como en el del tercio distal al comparar ambos

grupos de experimentación ( $P = 0,004$  en ambos casos) (ver *Figura 23 medio*). Los macrófagos estimulan la proliferación de los leiomiocitos de la media vascular y su migración hacia la íntima, así como el aumento de la producción de matriz extracelular, anomalía característica de la VCA. El grupo de aloinjertos sometidos a isquemia fría durante 7 horas presentó de manera significativa un mayor infiltrado macrofágico. Al ser los macrófagos uno de los principales efectores de la respuesta inmunitaria T CD4<sup>+</sup>, se explica la presencia de un RC de mayor intensidad en este grupo.

Los macrófagos presentan distintos tipos de especialización funcional. El fenotipo M1 favorece el desarrollo de episodios de RA mediante la liberación de radicales libres de oxígeno, eicosanoides y citoquinas como la IL-1, el TNF- $\alpha$  y la IL-18<sup>369</sup>; mientras que el fenotipo regulador M2 controla la respuesta inmunitaria mediante la liberación de IL-4 e IL-13<sup>225</sup>. Además, los monocitos/macrófagos también pueden colaborar en la reparación del daño tisular del aloinjerto mediante la liberación de factores proangiogénicos<sup>370</sup>. Estudios recientes de Mannon sugieren que cuando en un episodio de rechazo coexisten en un mismo aloinjerto macrófagos con una función lesiva y macrófagos con una función reguladora, poder polarizar toda la población macrofágica hacia este segundo subtipo podría ser de gran interés<sup>225</sup>. Ehrchen ha demostrado que la inmunosupresión con glucocorticoides combinada con inhibidores de mTOR, no sólo antagoniza a las células T sino que logra polarizar a la población macrofágica hacia el fenotipo regulador al aumentar su supervivencia mediante una inhibición de la apoptosis<sup>371,372</sup>. En este estudio el análisis del infiltrado macrofágico ha sido global, pero ante los altos contajes por campo de células CD68<sup>+</sup> sería interesante poder caracterizar el fenotipo de las mismas. Sin embargo, este análisis más detallado excede de los objetivos de este trabajo.

La respuesta humoral está relacionada directamente con el desarrollo del RC, y la presencia de AED circulantes se ha asociado de manera significativa con el hallazgo angiográfico de VCA y una menor supervivencia de los aloinjertos cardiacos<sup>373,374</sup>. Pacientes trasplantados cardiacos con formas rápidamente progresivas de VCA presentan títulos elevados de aloanticuerpos en forma IgM contra péptidos expresados por las células endoteliales<sup>375</sup>. Sin embargo, otros autores no han encontrado ninguna relación entre la presencia de aloanticuerpos circulantes y el desarrollo del RC<sup>376</sup>. El significado exacto de todos estos hallazgos está todavía por aclarar, ya que la presencia de títulos altos de AED puede deberse tanto a una respuesta inmunitaria humoral, como al estímulo de diferenciación y proliferación que experimentan los linfocitos B como consecuencia de la respuesta celular T CD4<sup>+</sup>. A pesar de que otros estudios han encontrado un infiltrado CD20<sup>+</sup> escaso<sup>293</sup>, en las biopsias musculares de los grupos sometidos a la preservación en frío encontramos contajes de células CD20<sup>+</sup> por campo más numerosos que los contajes relativamente bajos que presentaron los grupos sometidos al trasplante inmediato. Esta relación se mantuvo en ambos tercios musculares, y las diferencias fueron estadísticamente significativas tanto para el infiltrado linfocitario B CD20<sup>+</sup> del tercio medio como para el tercio distal ( $P = 0,004$  en ambos casos) (ver *Figura 23 superior*). Esta diferencia en los infiltrados CD20<sup>+</sup> también ha sido señalada por Solini en un modelo experimental de RC en trasplante renal con isquemia fría en ratas<sup>353</sup>. Este efecto podría explicar cómo la lesión por frío de las células endoteliales del aloinjerto expone los PMAD, que al ser reconocidos por los AED, desencadenan una respuesta inmunitaria a nivel vascular.

Para diagnosticar un episodio de rechazo humoral se requiere evidencia clínica de la disfunción del aloinjerto, evidencia histológica del daño tisular, evidencia anatomopatológica del daño por anticuerpos mediante la identificación del fragmento

del complemento C4d a nivel capilar (ver *Figura 3* y *Figura 16 inferior derecha*) y evidencia serológica de AED en el momento de la biopsia<sup>129-132</sup>. El daño endotelial producido por los aloanticuerpos depende fundamentalmente de la activación de la cascada del complemento. Los depósitos de C4d son transitorios, durando generalmente unos días más tras la eliminación o disminución de los AED circulantes<sup>377</sup>. Cuando se analizaron los depósitos de C4d en el estudio no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos de experimentación, ni para el tercio medio muscular ni para el distal ( $P = 0,059$  en ambos casos) (ver *Figura 23 inferior*). Sin embargo, la presencia de una tendencia estadística cercana al límite de la significación merece ser tomada en cuenta. Otro factor a señalar es que los depósitos encontrados no fueron muy elevados (medias de 0,39 y 0,56 para el grupo de trasplante inmediato, y de 1,05 y 1,22 para el grupo sometido a la isquemia fría, para el tercio medio y distal respectivamente en ambos grupos). *In vitro* se han propuesto varios mecanismos por los cuales los aloanticuerpos podrían activar a las células endoteliales<sup>378</sup>. En ausencia del complemento, se ha comprobado que los anticuerpos anti CMH tipo I son capaces de estimular la proliferación endotelial<sup>379</sup>. Los receptores para la fracción constante de los anticuerpos (Fc) podrían también estar involucrados. Las vías de señalización incluyen la sobreexpresión del receptor de factor de crecimiento de fibroblastos 1, la regulación al alza de la proteína de unión al guanósín trifosfato (GTP), y la reorganización del citoesqueleto<sup>380</sup>. El complemento también es capaz de estimular la proliferación de las células endoteliales por medio de la liberación de factores de crecimiento plaquetarios y fibroblásticos, así como el aumento de moléculas de adhesión tipo E-selectina y la producción de citoquinas<sup>381,382</sup>. En todo caso, los datos parecen apoyar la mayor afectación de las muestras sometidas a la preservación en frío, lo que indicaría una

mayor respuesta humoral y estaría en concordancia con los datos obtenidos del infiltrado linfocitario B CD20<sup>+</sup>.

Las citoquinas tienen un papel fundamental tanto en la aparición de los episodios de RA como en el desarrollo de un RC. Entre ellas se encuentran factores proinflamatorios como el TNF- $\alpha$  y la linfotoxina (TNF- $\beta$ ), necesarios para el desarrollo de los infiltrados inflamatorios, y también factores estimuladores de los macrófagos como el IFN- $\gamma$ . Las citoquinas identificables en las biopsias del TTC son liberadas en su mayor parte por el infiltrado leucocitario, aunque las células endoteliales del aloinjerto también van a producir sus propias citoquinas. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> normalmente se acaban especializando en la producción de un grupo de citoquinas de manera exclusiva<sup>366</sup>. Los CD4<sup>+</sup> indiferenciados que producen una mezcla variada de citoquinas se suelen llamar células T<sub>H0</sub>, los polarizados a la producción de IFN- $\gamma$  y linfotoxina son los T<sub>H1</sub>, las células T<sub>H2</sub> son las productoras de IL-4, IL-5 y IL-13, y por último el subtipo de células reguladoras productoras de IL-10 y TGF- $\beta$  son los T<sub>H3</sub> o T<sub>R</sub>. En los procesos inflamatorios crónicos suele haber una dominancia de alguno de estos subtipos. Las reacciones dominadas por T<sub>H1</sub> y T<sub>H2</sub> suelen caracterizarse por un proceso de fibrosis, como la que se da en los procesos de RC. Aun así no se observa una dominancia clara de alguno de estos subtipos en el RC. Estudiar las citoquinas presentes en el TTC permite dilucidar el subtipo de celularidad dominante. Los niveles de expresión génica en las muestras del trabajo no aportaron datos concluyentes (ver *Tabla 7*). Los niveles de TNF- $\alpha$  no presentaron diferencias estadísticamente significativas al comparar los dos grupos de experimentación, ni para el tercio medio muscular ni para el tercio distal ( $P = 0,150$  y  $P = 0,522$  respectivamente). Al medir la IL-6 se encontraron unos resultados parecidos, sin hallar diferencias significativas entre grupos en ambos tercios ( $P = 1,000$  para el tercio medio y  $P = 0,936$  para el tercio distal). Por último, las diferencias en las



mediciones de IL-10 tampoco resultaron significativas entre los grupos de experimentación, con una *P* de 0,150 para el tercio medio muscular y de 0,873 para el tercio distal. Esto no nos permitió aclarar el ambiente citoquímico en nuestros TTCs, y por tanto tampoco el subtipo de células T predominante en las muestras tisulares de un RC. La presencia de RC en el 100% de las biopsias tisulares puede ser una explicación a este fenómeno, ya que igualaría los niveles de las citoquinas presentes en las distintas muestras.

Este trabajo verifica que el daño asociado a la preservación en frío produce un aumento importante y significativo de los marcadores histológicos del RC. En TOS el RC es la causa más prevalente de fracaso tardío del aloinjerto, siendo responsable de un 30% de los fallecimientos tras el primer año post trasplante cardiaco, o afectando al 50% de los aloinjertos renales a los 10 años post trasplante<sup>199-201</sup>. En TTC no se ha documentado un gran número de casos de RC, 7 casos de 67 TTCs<sup>53</sup>, pero es de esperar que su número crezca conforme aumente el tiempo de seguimiento y nuestro conocimiento en este campo. El enfoque terapéutico del RC sigue siendo preventivo, sin ningún tratamiento efectivo una vez establecida la patología. De ahí la relevancia de este trabajo, ya que conocer los factores de riesgo no inmunitarios capaces de inducir un RC puede permitir tomar medidas para controlarlos y disminuir el riesgo de pérdida de los aloinjertos. Los resultados de este estudio señalan que la isquemia fría se comporta como un factor inductor del RC, pudiendo comprometer la viabilidad a largo plazo del aloinjerto. Una forma de evitar la fase de preservación fría, sería realizar el trasplante en quirófanos contiguos. La posibilidad de realizar la extracción del TTC y trasplantarlo de forma inmediata, reduciría no sólo la exposición del aloinjerto a la hipotermia, sino también el tiempo de isquemia. Hacen falta más estudios para aclarar el impacto real del RC en los TTC a nivel clínico; su impacto en la función del aloinjerto, hasta qué punto

se compromete la supervivencia del mismo, y que otros factores están relacionados con la inducción de este proceso.

## 5.1 LIMITACIONES DEL ESTUDIO.

Este estudio presenta unas limitaciones que hay que tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados obtenidos:

1. Primero la limitación en el número de animales, determinada estadísticamente y por la ejecución del modelo experimental. Esto impidió detectar con suficiente potencia algunas diferencias intergrupales que con un mayor tamaño muestral puede que hubiesen alcanzado la significación estadística (como es el caso del C4d, o el infiltrado CD4<sup>+</sup> en el tercio distal del aloinjerto).
2. Segundo, hay que tener en cuenta que para acelerar la expresión de la VCA se optó por un modelo a dosis infraterapéutica de inmunosupresión. Esto no se corresponde con la realidad de un TTC en “la práctica clínica habitual”, pero es una manera de desarrollar un modelo experimental de RC. Además, ciertos hallazgos del estudio es posible que no se hubiesen podido observar sin este aumento “artificial” de la incidencia del RC en los grupos de experimentación. Dado que la incidencia actual de la VCA en los TTCs es de un 10,45%<sup>53</sup>, en el caso de haber realizado el estudio en las condiciones de “práctica clínica habitual”, hubiese sido necesaria una población muestral de gran tamaño.
3. Tercero, la implantación heterotópica del aloinjerto, así como la ausencia de neurorrafias, miorrafas y osteosíntesis. Esto limita la interpretación de alguno de los resultados, ya que la fibrosis tisular, así como el daño isquémico, no se pueden relacionar con la funcionalidad de la extremidad trasplantada.



## **6 CONCLUSIONES.**



En este estudio los parámetros que valoran la vasculopatía crónica del aloinjerto se encuentran alterados de manera significativa en las muestras sometidas a preservación en frío a 4°C durante 7 horas, en comparación con los trasplantes realizados de manera inmediata. Esto nos permite rechazar la  $H_0$ , aceptar la  $H_1$  y verificar el objetivo principal de este trabajo, que la preservación en isquemia fría favorece el desarrollo de la vasculopatía crónica en los trasplantes de tejidos compuestos. La intensidad de la vasculopatía, así como su extensión y progresión distal, también parecen estar relacionadas con el frío de manera significativa.

En cuanto a los objetivos secundarios:

1. El análisis del infiltrado leucocitario a nivel de las biopsias tisulares profundas parece comportarse como un marcador de la intensidad del rechazo.
2. La expresión génica de las citoquinas no ha permitido aclarar cuáles son las principales implicadas ni qué tipo de respuesta es la predominante en un rechazo crónico.
3. El modelo experimental de vasculopatía crónica en el trasplante de pata en rata a dosis infraterapéuticas de inmunosupresión es un modelo reproducible de rechazo crónico. El desarrollo de este protocolo experimental permitió el entrenamiento microquirúrgico durante más de 250 horas.





## **7 BIBLIOGRAFÍA.**



1. Black KS, Hewitt CW, Fraser LA, et al. Cosmas and Damian in the laboratory. *N Engl J Med*. 1982;306:368-369.
2. Kahan BD. Cosmas and Damian revisited. *Transplant Proc*. 1983;15:2211-2216.
3. Tobin GR, Breidenbach WC, Ildstad ST, et al. The history of human composite tissue allotransplantation. *Transplant Proc*. 2009;41:466-471.
4. Gibson T, Medawar PB. The fate of skin homografts in man. *J Anat*. 1943;77:299-310 294.
5. Harrison JH, Merrill JP, Murray JE. Renal homotransplantation in identical twins. *Surg Forum*. 1956;6:432-436.
6. Merrill JP, Murray JE, Harrison JH, et al. Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins. *J Am Med Assoc*. 1956;160:277-282.
7. Murray JE, Merrill JP, Dammin GJ, et al. Study on transplantation immunity after total body irradiation: clinical and experimental investigation. *Surgery*. 1960;48:272-284.
8. Zukoski CF, Lee HM, Hume DM. The prolongation of functional survival of canine renal homografts by 6-mercaptopurine. *Surg Forum*. 1960;11:470-472.
9. Calne RY. The rejection of renal homografts. Inhibition in dogs by 6-mercaptopurine. *Lancet*. 1960;1:417-418.
10. Murray JE, Merrill JP, Harrison JH, et al. Prolonged survival of human-kidney homografts by immunosuppressive drug therapy. *N Engl J Med*. 1963;268:1315-1323.
11. Merrill JP, Murray JE, Takacs FJ, et al. Successful transplantation of kidney from a human cadaver. *JAMA*. 1963;185:347-353.
12. Goodwin WE, Kaufman JJ, Mims MM, et al. Human renal transplantation. I. Clinical experiences with six cases of renal homotransplantation. *J Urol*. 1963;89:13-24.
13. Barnard CN. The operation. A human cardiac transplant: an interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital, Cape Town. *S Afr Med J*. 1967;41:1271-1274.
14. Jordaan P. First heart transplant. *AORN J*. 1968;8:43-45.
15. Barnard CN. Human cardiac transplantation. An evaluation of the first two operations performed at the Groote Schuur Hospital, Cape Town. *Am J Cardiol*. 1968;22:584-596.

16. Borel JF, Kis ZL. The discovery and development of cyclosporine (Sandimmune). *Transplant Proc.* 1991;23:1867-1874.
17. Calne RY, Williams R, Dawson JL, et al. Liver transplantation in man. II. A report of two orthotopic liver transplants in adult recipients. *Br Med J.* 1968;4:541-546.
18. Calne RY, Williams R. Liver transplantation in man. I. Observations on technique and organization in five cases. *Br Med J.* 1968;4:535-540.
19. Stevens GH, Rangel DM, Yakeishi Y, et al. Technical problems in lung allotransplantation. Causes of pulmonary venous outflow obstruction. *Arch Surg.* 1969;99:506-512.
20. Beall AC, Jr., Weg JG, Stevens PM, et al. Human lung allotransplantation. Report of two cases. *Am J Surg.* 1970;119:300-310.
21. Margreiter R, Steiner E, Aigner F, et al. [Initial clinical experiences with allotransplantation of the pancreas]. *Wien Klin Wochenschr.* 1984;96:244-249.
22. Cohen Z, Silverman RE, Wassef R, et al. Small intestinal transplantation using cyclosporine. Report of a case. *Transplantation.* 1986;42:613-621.
23. Murray JE. The Nobel Lectures in Immunology. The Nobel Prize for Physiology or Medicine, 1990. The first successful organ transplants in man. *Scand J Immunol.* 1994;39:1-11.
24. Gilbert R. Transplant is successful with a cadaver forearm. *Med Trib Med News.* 1964;5:20.
25. Gilbert R. Hand transplanted from cadaver is reamputated. *Med Trib Med News.* 1964;5:23.
26. Murray JE. Organ transplantation (skin, kidney, heart) and the plastic surgeon. *Plast Reconstr Surg.* 1971;47:425-431.
27. Goto T, Kino T, Hatanaka H, et al. Discovery of FK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces tsukubaensis*. *Transplant Proc.* 1987;19:4-8.
28. Allison AC, Eugui EM. Immunosuppressive and other effects of mycophenolic acid and an ester prodrug, mycophenolate mofetil. *Immunol Rev.* 1993;136:5-28.
29. Morris RE, Hoyt EG, Murphy MP, et al. Mycophenolic acid morpholinoethylester (RS-61443) is a new immunosuppressant that prevents and halts heart allograft rejection by selective inhibition of T- and B-cell purine synthesis. *Transplant Proc.* 1990;22:1659-1662.
30. Sollinger HW, Belzer FO, Deierhoi MH, et al. RS-61443 (mycophenolate mofetil). A multicenter study for refractory kidney transplant rejection. *Ann Surg.* 1992;216:513-518; discussion 518-519.

31. Benhaim P, Anthony JP, Ferreira L, et al. Use of combination of low-dose cyclosporine and RS-61443 in a rat hindlimb model of composite tissue allotransplantation. *Transplantation*. 1996;61:527-532.
32. Ustuner ET, Zdichavsky M, Ren X, et al. Long-term composite tissue allograft survival in a porcine model with cyclosporine/mycophenolate mofetil therapy. *Transplantation*. 1998;66:1581-1587.
33. Jones JW, Jr., Ustuner ET, Zdichavsky M, et al. Long-term survival of an extremity composite tissue allograft with FK506-mycophenolate mofetil therapy. *Surgery*. 1999;126:384-388.
34. Hofmann GO, Kirschner MH, Wagner FD, et al. Allogeneic vascularized grafting of human knee joints under postoperative immunosuppression of the recipient. *World J Surg*. 1998;22:818-823.
35. Hofmann GO, Kirschner MH. Clinical experience in allogeneic vascularized bone and joint allografting. *Microsurgery*. 2000;20:375-383.
36. Diefenbeck M, Wagner F, Kirschner MH, et al. Management of acute rejection 2 years after allogeneic vascularized knee joint transplantation. *Transpl Int*. 2006;19:604-606.
37. Diefenbeck M, Nerlich A, Schneeberger S, et al. Allograft vasculopathy after allogeneic vascularized knee transplantation. *Transpl Int*. 2011;24:e1-5.
38. Strome M, Stein J, Esclamado R, et al. Laryngeal transplantation and 40-month follow-up. *N Engl J Med*. 2001;344:1676-1679.
39. Lorenz RR, Hicks DM, Shields RW, Jr., et al. Laryngeal nerve function after total laryngeal transplantation. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004;131:1016-1018.
40. Birchall MA, Lorenz RR, Berke GS, et al. Laryngeal transplantation in 2005: a review. *Am J Transplant*. 2006;6:20-26.
41. Khariwala SS, Lorenz RR, Strome M. Laryngeal transplantation: research, clinical experience, and future goals. *Semin Plast Surg*. 2007;21:234-241.
42. Tintinago LF. Trachea/esophageal transplantation. 7th International Symposium on Composite Tissue Allotransplantation. Seefeld, Austria; 2007
43. Dubernard JM, Owen E, Herzberg G, et al. Human hand allograft: report on first 6 months. *Lancet*. 1999;353:1315-1320.
44. Jones JW, Gruber SA, Barker JH, et al. Successful hand transplantation. One-year follow-up. Louisville Hand Transplant Team. *N Engl J Med*. 2000;343:468-473.
45. Francois CG, Breidenbach WC, Maldonado C, et al. Hand transplantation: comparisons and observations of the first four clinical cases. *Microsurgery*. 2000;20:360-371.

46. Kaufman CL, Blair B, Murphy E, et al. A new option for amputees: transplantation of the hand. *J Rehabil Res Dev*. 2009;46:395-404.
47. Breidenbach WC, Gonzales NR, Kaufman CL, et al. Outcomes of the first 2 American hand transplants at 8 and 6 years posttransplant. *J Hand Surg Am*. 2008;33:1039-1047.
48. Dubernard JM, Petruzzo P, Lanzetta M, et al. Functional results of the first human double-hand transplantation. *Ann Surg*. 2003;238:128-136.
49. Shores JT, Brandacher G, Schneeberger S, et al. Composite tissue allotransplantation: hand transplantation and beyond. *J Am Acad Orthop Surg*. 2010;18:127-131.
50. Schneeberger S, Landin L, Jableki J, et al. Achievements and challenges in composite tissue allotransplantation. *Transpl Int*. 2011;24:760-769.
51. Landin L, Bonastre J, Casado-Sanchez C, et al. Outcomes with respect to disabilities of the upper limb after hand allograft transplantation: a systematic review. *Transpl Int*. 2012;25:424-432.
52. Beaton DE, Katz JN, Fossel AH, et al. Measuring the whole or the parts? Validity, reliability, and responsiveness of the Disabilities of the Arm, Shoulder and Hand outcome measure in different regions of the upper extremity. *J Hand Ther*. 2001;14:128-146.
53. Petruzzo P, Lanzetta M, Dubernard JM, et al. The International Registry on Hand and Composite Tissue Transplantation. *Transplantation*. 2010;90:1590-1594.
54. Morelon E, Kanitakis J, Petruzzo P. Immunological issues in clinical composite tissue allotransplantation: where do we stand today? *Transplantation*. 2012;93:855-859.
55. Bonastre J, Landin L, Diez J, et al. Factors influencing acute rejection of human hand allografts: a systematic review. *Ann Plast Surg*. 2012;68:624-629.
56. Margreiter R, Brandacher G, Ninkovic M, et al. A double-hand transplant can be worth the effort! *Transplantation*. 2002;74:85-90.
57. Lanzetta M, Pozzo M, Bottin A, et al. Reinnervation of motor units in intrinsic muscles of a transplanted hand. *Neurosci Lett*. 2005;373:138-143.
58. Schneeberger S, Gorantla VS, van Riet RP, et al. Atypical acute rejection after hand transplantation. *Am J Transplant*. 2008;8:688-696.
59. Schneeberger S, Lucchina S, Lanzetta M, et al. Cytomegalovirus-related complications in human hand transplantation. *Transplantation*. 2005;80:441-447.
60. Schneeberger S, Kreczy A, Brandacher G, et al. Steroid- and ATG-resistant rejection after double forearm transplantation responds to Campath-1H. *Am J Transplant*. 2004;4:1372-1374.

61. Petruzzo P, Badet L, Gazarian A, et al. Bilateral hand transplantation: six years after the first case. *Am J Transplant*. 2006;6:1718-1724.
62. Brandacher G, Ninkovic M, Piza-Katzer H, et al. The Innsbruck hand transplant program: update at 8 years after the first transplant. *Transplant Proc*. 2009;41:491-494.
63. Ravindra KV, Buell JF, Kaufman CL, et al. Hand transplantation in the United States: experience with 3 patients. *Surgery*. 2008;144:638-643.
64. Cavadas PC, Landin L, Ibanez J. Bilateral hand transplantation: result at 20 months. *J Hand Surg Eur Vol*. 2009;34:434-443.
65. Landin L, Cavadas PC, Rodriguez-Perez JC, et al. Improvement in renal function after late conversion to sirolimus-based immunosuppression in composite tissue allotransplantation. *Transplantation*. 2010;90:691-692.
66. Cavadas PC, Landin L, Thione A, et al. The Spanish experience with hand, forearm, and arm transplantation. *Hand Clin*. 2011;27:443-453.
67. Schneeberger S. The Pittsburgh Hand Transplant Program – Early experience with a novel immunomodulatory protocol in two patients. American Transplant Congress San Diego; 2010:180-181.
68. Gordon CR, Siemionow M, Papay F, et al. The world's experience with facial transplantation: what have we learned thus far? *Ann Plast Surg*. 2009;63:572-578.
69. Tuder D, Pederson WC, Abrahamian GA, et al. San Antonio military and civilian hand transplantation program: a case report. *Transplant Proc*. 2011;43:3561-3562.
70. Lang RS, Gorantla VS, Esper S, et al. Anesthetic management in upper extremity transplantation: the Pittsburgh experience. *Anesth Analg*. 2012;115:678-688.
71. Kaufman CL, Breidenbach W. World experience after more than a decade of clinical hand transplantation: update from the Louisville hand transplant program. *Hand Clin*. 2011;27:417-421.
72. Del Bene M, Di Caprio AP, Melzi ML, et al. Autologous mesenchymal stem cells as a new strategy in immunosuppressant therapy in double hand allotransplantation. *Plast Reconstr Surg*. 2013;131:305e-307e.
73. Hand Transplant History. Available at: <http://www.handtransplant.com/TheProcedure/HandTransplantHistory/tabid/96/Default.aspx>. Accessed 19 January, 2015
74. Dwyer KM, Webb AR, Furniss HS, et al. First hand transplant procedure in Australia: outcome at 2 years. *Med J Aust*. 2013;199:285-287.
75. Carty MJ, Hivelin M, Dumontier C, et al. Lessons learned from simultaneous face and bilateral hand allotransplantation. *Plast Reconstr Surg*. 2013;132:423-432.

76. Dahlborg EJ, Diaz-Siso JR, Bueno EM, et al. The value of innovation: face and hand transplantation programs at Brigham and Women's Hospital. *Plast Reconstr Surg*. 2014;134:178e-179e.
77. Levin LS. Monograph on hand transplantation. *Tech Hand Up Extrem Surg*. 2013;17:207.
78. Swanson EW, Brandacher G, Gordon CR. Discussion of lessons learned from the first quadruple extremity transplantation in the world: comments and concerns regarding quadruple extremity allotransplantation. *Ann Plast Surg*. 2014;73:343-345.
79. Kaufman CL, Ouseph R, Marvin MR, et al. Monitoring and long-term outcomes in vascularized composite allotransplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2013;18:652-658.
80. Nasir S, Kilic YA, Karaaltin MV, et al. Lessons learned from the first quadruple extremity transplantation in the world. *Ann Plast Surg*. 2014;73:336-340.
81. Landin L, Dominguez A, Sanchez-Sanchez M. Discussion of lessons learned from the first quadruple extremity transplantation in the world: the logic of massive allograft transplantation. *Ann Plast Surg*. 2014;73:341-342.
82. Eberlin KR, Leonard DA, Austen WG, Jr., et al. The volar forearm fasciocutaneous extension: a strategy to maximize vascular outflow in post-burn injury hand transplantation. *Plast Reconstr Surg*. 2014;134:731-735.
83. Mayor S. UK surgical team reports encouraging early results of first hand transplantation. *BMJ*. 2013;346:f79.
84. Kalantar-Hormozi A, Firoozi F, Yavari M, et al. The first hand transplantation in iran. *Int J Organ Transplant Med*. 2013;4:125-127.
85. Zuker RM, Redett R, Alman B, et al. First successful lower-extremity transplantation: technique and functional result. *J Reconstr Microsurg*. 2006;22:239-244.
86. Fattah A, Cypel T, Donner EJ, et al. The first successful lower extremity transplantation: 6-year follow-up and implications for cortical plasticity. *Am J Transplant*. 2011;11:2762-2767.
87. de Lago M. World's first double leg transplantation is carried out in Spain. *BMJ*. 2011;343:d4541.
88. Cavadas PC, Thione A, Carballeira A, et al. Bilateral transfemoral lower extremity transplantation: result at 1 year. *Am J Transplant*. 2013;13:1343-1349.
89. Devauchelle B, Badet L, Lengele B, et al. First human face allograft: early report. *Lancet*. 2006;368:203-209.



90. Dubernard JM, Lengele B, Morelon E, et al. Outcomes 18 months after the first human partial face transplantation. *N Engl J Med*. 2007;357:2451-2460.
91. Barret JP, Gavalda J, Bueno J, et al. Full face transplant: the first case report. *Ann Surg*. 2011;254:252-256.
92. Barret JP, Serracanta J, Collado JM, et al. Full face transplantation organization, development, and results--the Barcelona experience: a case report. *Transplant Proc*. 2011;43:3533-3534.
93. Barret JP, Serracanta J. LeFort I osteotomy and secondary procedures in full-face transplant patients. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2013;66:723-725.
94. Diaz-Siso JR, Bueno EM, Sisk GC, et al. Vascularized composite tissue allotransplantation - state of the art. *Clin Transplant*. 2013;27:330-337.
95. Rose KG, Sesterhenn K, Wustrow F. Tracheal allotransplantation in man. *Lancet*. 1979;1:433.
96. Birchall M. Tongue transplantation. *Lancet*. 2004;363:1663.
97. Jiang HQ, Wang Y, Hu XB, et al. Composite tissue allograft transplantation of cephalocervical skin flap and two ears. *Plast Reconstr Surg*. 2005;115:31e-35e; discussion 36e-37e.
98. Jones TR, Humphrey PA, Brennan DC. Transplantation of vascularized allogeneic skeletal muscle for scalp reconstruction in renal transplant patient. *Transplant Proc*. 1998;30:2746-2753.
99. Evans PJ, Midha R, Mackinnon SE. The peripheral nerve allograft: a comprehensive review of regeneration and neuroimmunology. *Prog Neurobiol*. 1994;43:187-233.
100. Selvaggi G, Levi DM, Kato T, et al. Expanded use of transplantation techniques: abdominal wall transplantation and intestinal autotransplantation. *Transplant Proc*. 2004;36:1561-1563.
101. Fageeh W, Raffa H, Jabbad H, et al. Transplantation of the human uterus. *Int J Gynaecol Obstet*. 2002;76:245-251.
102. Hu W, Lu J, Zhang L, et al. A preliminary report of penile transplantation. *Eur Urol*. 2006;50:851-853.
103. Hu W, Lu J, Zhang L, et al. A preliminary report of penile transplantation: part 2. *Eur Urol*. 2006;50:1115-1116; discussion 1116.
104. Campbell RD, Trowsdale J. Map of the human MHC. *Immunol Today*. 1993;14:349-352.

105. Womer KL, Sayegh MH, Auchincloss H, Jr. Involvement of the direct and indirect pathways of allorecognition in tolerance induction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001;356:639-647.
106. Kirk AD. Immunology of Transplantation. In: Norton JA, Randal Bollinger R, Chang AE, et al., eds. *Surgery: Basic Science and Clinical Evidence*. New York: Springer; 2000:págs:1403-1429.
107. Baumeister S, Kleist C, Dohler B, et al. Risks of allogeneic hand transplantation. *Microsurgery.* 2004;24:98-103.
108. Mathew JM, Ruiz P. Immunopathology of Organ Transplantation. In: Ruiz P, ed. *Transplantation Pathology*. New York: Cambridge University Press; 2009:págs:1-25.
109. Doyle C, Strominger JL. Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *J Immunol.* 2010;184:5935-5938.
110. Bach F, Hirschhorn K. Lymphocyte Interaction: a potential histocompatibility test in vitro. *Science.* 1964;143::813-814.
111. Lee RS, Yamada K, Houser SL, et al. Indirect allorecognition promotes the development of cardiac allograft vasculopathy. *Transplant Proc.* 2001;33:308-310.
112. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med.* 2004;351:2715-2729.
113. Wang D, Matsumoto R, You Y, et al. CD3/CD28 costimulation-induced NF-kappaB activation is mediated by recruitment of protein kinase C-theta, Bcl10, and IkappaB kinase beta to the immunological synapse through CARMA1. *Mol Cell Biol.* 2004;24:164-171.
114. Rogers NJ, Lechler RI. Allorecognition. *Am J Transplant.* 2001;1:97-102.
115. Zhou P, Hwang KW, Palucki DA, et al. Impaired NF-kappaB activation in T cells permits tolerance to primary heart allografts and to secondary donor skin grafts. *Am J Transplant.* 2003;3:139-147.
116. Dai Z, Nasr IW, Reel M, et al. Impaired recall of CD8 memory T cells in immunologically privileged tissue. *J Immunol.* 2005;174:1165-1170.
117. Zecher D, Li Q, Oberbarnscheidt MH, et al. NK cells delay allograft rejection in lymphopenic hosts by downregulating the homeostatic proliferation of CD8+ T cells. *J Immunol.* 2010;184:6649-6657.
118. Eun SC. Composite tissue allotransplantation immunology. *Arch Plast Surg.* 2013;40:141-153.
119. Game DS, Lechler RI. Pathways of allorecognition: implications for transplantation tolerance. *Transpl Immunol.* 2002;10:101-108.

120. Gould DS, Auchincloss H, Jr. Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection. *Immunol Today*. 1999;20:77-82.
121. Pietra BA, Wiseman A, Bolwerk A, et al. CD4 T cell-mediated cardiac allograft rejection requires donor but not host MHC class II. *J Clin Invest*. 2000;106:1003-1010.
122. Auchincloss H, Jr., Lee R, Shea S, et al. The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:3373-3377.
123. Lowry RP. DTH-induced tissue injury. In: Tilney NL, Strom TB, Paul LE, eds. *Transplantation Biology: Cellular and Molecular Aspects*. Philadelphia: Lippincott Raven; 1996:págs:487-502.
124. Biedermann BC, Pober JS. Human endothelial cells induce and regulate cytolytic T cell differentiation. *J Immunol*. 1998;161:4679-4687.
125. Biedermann BC, Pober JS. Human vascular endothelial cells favor clonal expansion of unusual alloreactive CTL. *J Immunol*. 1999;162:7022-7030.
126. Feucht HE, Schneeberger H, Hillebrand G, et al. Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney Int*. 1993;43:1333-1338.
127. Feucht HE, Felber E, Gokel MJ, et al. Vascular deposition of complement-split products in kidney allografts with cell-mediated rejection. *Clin Exp Immunol*. 1991;86:464-470.
128. Baldwin WM, 3rd, Pruitt SK, Brauer RB, et al. Complement in organ transplantation. Contributions to inflammation, injury, and rejection. *Transplantation*. 1995;59:797-808.
129. Behr TM, Feucht HE, Richter K, et al. Detection of humoral rejection in human cardiac allografts by assessing the capillary deposition of complement fragment C4d in endomyocardial biopsies. *J Heart Lung Transplant*. 1999;18:904-912.
130. Sijpkens YW, Joosten SA, Wong MC, et al. Immunologic risk factors and glomerular C4d deposits in chronic transplant glomerulopathy. *Kidney Int*. 2004;65:2409-2418.
131. Landin L, Cavadas PC, Ibanez J, et al. CD3+-mediated rejection and C4d deposition in two composite tissue (bilateral hand) allograft recipients after induction with alemtuzumab. *Transplantation*. 2009;87:776-781.
132. Kanitakis J, McGregor B, Badet L, et al. Absence of c4d deposition in human composite tissue (hands and face) allograft biopsies: an immunoperoxidase study. *Transplantation*. 2007;84:265-267.
133. Fedrigo M, Feltrin G, Poli F, et al. Intravascular macrophages in cardiac allograft biopsies for diagnosis of early and late antibody-mediated rejection. *J Heart Lung Transplant*. 2013;32:404-409.

134. Lederer SR, Kluth-Pepper B, Schneeberger H, et al. Impact of humoral alloreactivity early after transplantation on the long-term survival of renal allografts. *Kidney Int.* 2001;59:334-341.
135. Bohmig G, Regele H. Diagnosis and treatment of antibody-mediated kidney allograft rejection. *Transpl Int.* 2003;16:773-787.
136. Feucht HE, Lederer SR, Kluth B. Humoral alloreactivity in recipients of renal allografts as a risk factor for the development of delayed graft function. *Transplantation.* 1998;65:757-758.
137. Moreau A, Varey E, Anegon I, et al. Effector mechanisms of rejection. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3
138. Jiang X, Tian W, Sung YK, et al. Macrophages in solid organ transplantation. *Vasc Cell.* 2014;6:5.
139. Schenkel AR, Mamdouh Z, Chen X, et al. CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nat Immunol.* 2002;3:143-150.
140. Valenzuela NM, Hong L, Shen XD, et al. Blockade of p-selectin is sufficient to reduce MHC I antibody-elicited monocyte recruitment in vitro and in vivo. *Am J Transplant.* 2013;13:299-311.
141. Grandaliano G, Gesualdo L, Ranieri E, et al. Monocyte chemotactic peptide-1 expression and monocyte infiltration in acute renal transplant rejection. *Transplantation.* 1997;63:414-420.
142. Le Meur Y, Jose MD, Mu W, et al. Macrophage colony-stimulating factor expression and macrophage accumulation in renal allograft rejection. *Transplantation.* 2002;73:1318-1324.
143. Mitchell RN. Graft vascular disease: immune response meets the vessel wall. *Annu Rev Pathol.* 2009;4:19-47.
144. Nagata S, Suda T. Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunol Today.* 1995;16:39-43.
145. Moll S, Pascual M. Humoral rejection of organ allografts. *Am J Transplant.* 2005;5:2611-2618.
146. Williams JM, Holzknecht ZE, Plummer TB, et al. Acute vascular rejection and accommodation: divergent outcomes of the humoral response to organ transplantation. *Transplantation.* 2004;78:1471-1478.
147. Rodriguez ER, Skojec DV, Tan CD, et al. Antibody-mediated rejection in human cardiac allografts: evaluation of immunoglobulins and complement activation products C4d and C3d as markers. *Am J Transplant.* 2005;5:2778-2785.

148. Kimball JA, Pescovitz MD, Book BK, et al. Reduced human IgG anti-ATGAM antibody formation in renal transplant recipients receiving mycophenolate mofetil. *Transplantation*. 1995;60:1379-1383.
149. Hautz T, Zelger BG, Weissenbacher A, et al. Standardizing skin biopsy sampling to assess rejection in vascularized composite allotransplantation. *Clin Transplant*. 2013;27:E81-90.
150. Cendales LC, Kanitakis J, Schneeberger S, et al. The Banff 2007 working classification of skin-containing composite tissue allograft pathology. *Am J Transplant*. 2008;8:1396-1400.
151. Kanitakis J, Jullien D, Petruzzo P, et al. Clinicopathologic features of graft rejection of the first human hand allograft. *Transplantation*. 2003;76:688-693.
152. Cendales LC, Kirk AD, Moresi JM, et al. Composite tissue allotransplantation: classification of clinical acute skin rejection. *Transplantation*. 2006;81:418-422.
153. Racusen LC, Halloran PF, Solez K. Banff 2003 meeting report: new diagnostic insights and standards. *Am J Transplant*. 2004;4:1562-1566.
154. Hautz T, Brandacher G, Zelger B, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase and foxp3 expression in skin rejection of human hand allografts. *Transplant Proc*. 2009;41:509-512.
155. J.I. Gallin IMG, R. Snyderman. Inflammation. Basic principles and clinical correlates, ed 2. New York: Raven Press; 1992.
156. Vilcek J, Lee TH. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem*. 1991;266:7313-7316.
157. Beutler B, Cerami A. The common mediator of shock, cachexia, and tumor necrosis. *Adv Immunol*. 1988;42:213-231.
158. Warren JS. Interleukins and tumor necrosis factor in inflammation. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 1990;28:37-59.
159. Paul NL, Ruddle NH. Lymphotoxin. *Annu Rev Immunol*. 1988;6:407-438.
160. Miethke T, Gaus H, Wahl C, et al. T-cell-dependent shock induced by a bacterial superantigen. *Chem Immunol*. 1992;55:172-184.
161. Miethke T, Wahl C, Heeg K, et al. T cell-mediated lethal shock triggered in mice by the superantigen staphylococcal enterotoxin B: critical role of tumor necrosis factor. *J Exp Med*. 1992;175:91-98.
162. Van Snick J. Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol*. 1990;8:253-278.
163. Hirano T. The biology of interleukin-6. *Chem Immunol*. 1992;51:153-180.

164. Hirano T, Taga T, Matsuda T, et al. Interleukin 6 and its receptor in the immune response and hematopoiesis. *Int J Cell Cloning*. 1990;8 Suppl 1:155-166; discussion 166-157.
165. Hirano T. Interleukin-6 and its relation to inflammation and disease. *Clin Immunol Immunopathol*. 1992;62:S60-65.
166. Tan PL, Farmiloe S, Yeoman S, et al. Expression of the interleukin 6 gene in rheumatoid synovial fibroblasts. *J Rheumatol*. 1990;17:1608-1612.
167. Feghali CA, Bost KL, Boulware DW, et al. Mechanisms of pathogenesis in scleroderma. I. Overproduction of interleukin 6 by fibroblasts cultured from affected skin sites of patients with scleroderma. *J Rheumatol*. 1992;19:1207-1211.
168. Koike K, Ogawa M, Ihle JN, et al. Recombinant murine granulocyte-macrophage (GM) colony-stimulating factor supports formation of GM and multipotential blast cell colonies in culture: comparison with the effects of interleukin-3. *J Cell Physiol*. 1987;131:458-464.
169. Chen WF, Zlotnik A. IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor. *J Immunol*. 1991;147:528-534.
170. de Waal Malefyt R, Yssel H, Roncarolo MG, et al. Interleukin-10. *Curr Opin Immunol*. 1992;4:314-320.
171. Mosmann TR, Moore KW. The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. *Immunol Today*. 1991;12:A49-53.
172. Moore KW, Vieira P, Fiorentino DF, et al. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science*. 1990;248:1230-1234.
173. Siemionow M, Klimczak A. Tolerance and future directions for composite tissue allograft transplants: part II. *Plast Reconstr Surg*. 2009;123:7e-17e.
174. Opelz G, Dohler B. Lymphomas after solid organ transplantation: a collaborative transplant study report. *Am J Transplant*. 2004;4:222-230.
175. Schneeberger S, Ninkovic M, Piza-Katzer H, et al. Status 5 years after bilateral hand transplantation. *Am J Transplant*. 2006;6:834-841.
176. Schneeberger S, Ninkovic M, Gabl M, et al. First forearm transplantation: outcome at 3 years. *Am J Transplant*. 2007;7:1753-1762.
177. Gazarian A, Abrahamyan DO, Petruzzio P, et al. [Hand allografts: experience from Lyon team]. *Ann Chir Plast Esthet*. 2007;52:424-435.
178. Bonatti H, Lass-Flörl C, Zelger B, et al. *Alternaria alternata* soft tissue infection in a forearm transplant recipient. *Surg Infect (Larchmt)*. 2007;8:539-544.

179. Landin L, Cavadas PC, Nthumba P, et al. Preliminary results of bilateral arm transplantation. *Transplantation*. 2009;88:749-751.
180. Bonatti H, Brandacher G, Margreiter R, et al. Infectious complications in three double hand recipients: experience from a single center. *Transplant Proc*. 2009;41:517-520.
181. Landin L, Cavadas PC, Garcia-Cosmes P, et al. Perioperative ischemic injury and fibrotic degeneration of muscle in a forearm allograft: functional follow-up at 32 months post transplantation. *Ann Plast Surg*. 2011;66:202-209.
182. Schuind F, Van Holder C, Mouraux D, et al. The first Belgian hand transplantation--37 month term results. *J Hand Surg Br*. 2006;31:371-376.
183. Crabtree GR, Schreiber SL. SnapShot: Ca<sup>2+</sup>-calcineurin-NFAT signaling. *Cell*. 2009;138:210e.
184. Batiuk TD, Pazderka F, Halloran PF. Calcineurin activity is only partially inhibited in leukocytes of cyclosporine-treated patients. *Transplantation*. 1995;59:1400-1404.
185. Borel JF. Comparative study of in vitro and in vivo drug effects on cell-mediated cytotoxicity. *Immunology*. 1976;31:631-641.
186. Harder F, Loertscher R, Thiel G. Cyclosporin in cadaveric renal transplantation: one-year follow-up of a multicentre trial. *Lancet*. 1983;2:986-989.
187. Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, et al. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med*. 2000;342:605-612.
188. Calne RY, Rolles K, White DJ, et al. Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreases, and 2 livers. *Lancet*. 1979;2:1033-1036.
189. Williams D, Haragsim L. Calcineurin nephrotoxicity. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2006;13:47-55.
190. Naesens M, Kuypers DR, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4:481-508.
191. Heering P, Grabensee B. Influence of cyclosporin A on renal tubular function after kidney transplantation. *Nephron*. 1991;59:66-70.
192. Murray BM, Paller MS, Ferris TF. Effect of cyclosporine administration on renal hemodynamics in conscious rats. *Kidney Int*. 1985;28:767-774.
193. Myers BD, Ross J, Newton L, et al. Cyclosporine-associated chronic nephropathy. *N Engl J Med*. 1984;311:699-705.
194. Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, et al. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med*. 2007;357:2562-2575.

195. Ekberg H, Grinyo J, Nashan B, et al. Cyclosporine sparing with mycophenolate mofetil, daclizumab and corticosteroids in renal allograft recipients: the CAESAR Study. *Am J Transplant.* 2007;7:560-570.
196. Vincenti F, Charpentier B, Vanrenterghem Y, et al. A phase III study of belatacept-based immunosuppression regimens versus cyclosporine in renal transplant recipients (BENEFIT study). *Am J Transplant.* 2010;10:535-546.
197. Gaston RS, Cecka JM, Kasiske BL, et al. Evidence for antibody-mediated injury as a major determinant of late kidney allograft failure. *Transplantation.* 2010;90:68-74.
198. Ojo AO, Held PJ, Port FK, et al. Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ. *N Engl J Med.* 2003;349:931-940.
199. Womer KL, Vella JP, Sayegh MH. Chronic allograft dysfunction: mechanisms and new approaches to therapy. *Semin Nephrol.* 2000;20:126-147.
200. Joosten SA, Sijpkens YW, van Kooten C, et al. Chronic renal allograft rejection: pathophysiological considerations. *Kidney Int.* 2005;68:1-13.
201. Hertz MI. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation--Introduction to the 2012 annual reports: new leadership, same vision. *J Heart Lung Transplant.* 2012;31:1045-1051.
202. Tullius SG, Tilney NL. Both alloantigen-dependent and -independent factors influence chronic allograft rejection. *Transplantation.* 1995;59:313-318.
203. Unadkat JV, Schneeberger S, Horibe EH, et al. Composite tissue vasculopathy and degeneration following multiple episodes of acute rejection in reconstructive transplantation. *Am J Transplant.* 2010;10:251-261.
204. Wang CY, Aronson I, Takuma S, et al. cAMP pulse during preservation inhibits the late development of cardiac isograft and allograft vasculopathy. *Circ Res.* 2000;86:982-988.
205. Libby P, Pober JS. Chronic rejection. *Immunity.* 2001;14:387-397.
206. Lindholm A, Ohlman S, Albrechtsen D, et al. The impact of acute rejection episodes on long-term graft function and outcome in 1347 primary renal transplants treated by 3 cyclosporine regimens. *Transplantation.* 1993;56:307-315.
207. Basadonna GP, Matas AJ, Gillingham KJ, et al. Early versus late acute renal allograft rejection: impact on chronic rejection. *Transplantation.* 1993;55:993-995.
208. Kouwenhoven EA, JN II, de Bruin RW. Etiology and pathophysiology of chronic transplant dysfunction. *Transpl Int.* 2000;13:385-401.
209. Matas AJ, Gillingham KJ, Payne WD, et al. The impact of an acute rejection episode on long-term renal allograft survival (t1/2). *Transplantation.* 1994;57:857-859.



210. Akioka K, Takahara S, Ichikawa S, et al. Factors predicting long-term graft survival after kidney transplantation: multicenter study in Japan. *World J Surg.* 2005;29:249-256.
211. Schneeberger S, Amberger A, Mandl J, et al. Cold ischemia contributes to the development of chronic rejection and mitochondrial injury after cardiac transplantation. *Transpl Int.* 2010;23:1282-1292.
212. Syrjala SO, Keranen MA, Tuuminen R, et al. Increased Th17 rather than Th1 alloimmune response is associated with cardiac allograft vasculopathy after hypothermic preservation in the rat. *J Heart Lung Transplant.* 2010;29:1047-1057.
213. Kuecuk O, Mantouvalou L, Klemz R, et al. Significant reduction of proinflammatory cytokines by treatment of the brain-dead donor. *Transplant Proc.* 2005;37:387-388.
214. Takada M, Nadeau KC, Shaw GD, et al. The cytokine-adhesion molecule cascade in ischemia/reperfusion injury of the rat kidney. Inhibition by a soluble P-selectin ligand. *J Clin Invest.* 1997;99:2682-2690.
215. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006;124:783-801.
216. Martinon F, Tschopp J. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol.* 2005;26:447-454.
217. Rubartelli A, Lotze MT. Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends Immunol.* 2007;28:429-436.
218. la Sala A, Ferrari D, Di Virgilio F, et al. Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. *J Leukoc Biol.* 2003;73:339-343.
219. Bernard JJ, Cowing-Zitron C, Nakatsuji T, et al. Ultraviolet radiation damages self noncoding RNA and is detected by TLR3. *Nat Med.* 2012;18:1286-1290.
220. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature.* 2002;418:191-195.
221. Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;322:1111-1122.
222. Scheibner KA, Lutz MA, Boodoo S, et al. Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J Immunol.* 2006;177:1272-1281.
223. Land WG. The role of postischemic reperfusion injury and other nonantigen-dependent inflammatory pathways in transplantation. *Transplantation.* 2005;79:505-514.

224. Kosieradzki M, Kuczynska J, Piwowarska J, et al. Prognostic significance of free radicals: mediated injury occurring in the kidney donor. *Transplantation*. 2003;75:1221-1227.
225. Mannon RB. Macrophages: contributors to allograft dysfunction, repair, or innocent bystanders? *Curr Opin Organ Transplant*. 2012;17:20-25.
226. Gill RG. NK cells: elusive participants in transplantation immunity and tolerance. *Curr Opin Immunol*. 2010;22:649-654.
227. Methe H, Zimmer E, Grimm C, et al. Evidence for a role of toll-like receptor 4 in development of chronic allograft rejection after cardiac transplantation. *Transplantation*. 2004;78:1324-1331.
228. Caterson EJ, Lopez J, Medina M, et al. Ischemia-reperfusion injury in vascularized composite allotransplantation. *J Craniofac Surg*. 2013;24:51-56.
229. Halloran PF, Homik J, Goes N, et al. The "injury response": a concept linking nonspecific injury, acute rejection, and long-term transplant outcomes. *Transplant Proc*. 1997;29:79-81.
230. Tullius SG, Reutzel-Selke A, Egermann F, et al. Contribution of prolonged ischemia and donor age to chronic renal allograft dysfunction. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11:1317-1324.
231. Boucek MM, Aurora P, Edwards LB, et al. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: tenth official pediatric heart transplantation report--2007. *J Heart Lung Transplant*. 2007;26:796-807.
232. Pradka SP, Ong YS, Zhang Y, et al. Increased signs of acute rejection with ischemic time in a rat musculocutaneous allotransplant model. *Transplant Proc*. 2009;41:531-536.
233. Chertow GM, Brenner BM, Mackenzie HS, et al. Non-immunologic predictors of chronic renal allograft failure: data from the United Network of Organ Sharing. *Kidney Int Suppl*. 1995;52:S48-51.
234. Ponticelli C, Cucchiari D, Graziani G. Hypertension in kidney transplant recipients. *Transpl Int*. 2011;24:523-533.
235. Wadei HM, Textor SC. Hypertension in the kidney transplant recipient. *Transplant Rev (Orlando)*. 2010;24:105-120.
236. Hillebrand U, Suwelack BM, Loley K, et al. Blood pressure, antihypertensive treatment, and graft survival in kidney transplant patients. *Transpl Int*. 2009;22:1073-1080.
237. Khalkhali HR, Ghafari A, Hajizadeh E, et al. Risk factors of long-term graft loss in renal transplant recipients with chronic allograft dysfunction. *Exp Clin Transplant*. 2010;8:277-282.

238. Colvin-Adams M, Agnihotri A. Cardiac allograft vasculopathy: current knowledge and future direction. *Clin Transplant*. 2011;25:175-184.
239. Becker DM, Chamberlain B, Swank R, et al. Relationship between corticosteroid exposure and plasma lipid levels in heart transplant recipients. *Am J Med*. 1988;85:632-638.
240. Ballantyne CM, Radovancevic B, Farmer JA, et al. Hyperlipidemia after heart transplantation: report of a 6-year experience, with treatment recommendations. *J Am Coll Cardiol*. 1992;19:1315-1321.
241. den Dekker WK, Cheng C, Pasterkamp G, et al. Toll like receptor 4 in atherosclerosis and plaque destabilization. *Atherosclerosis*. 2010;209:314-320.
242. Eich D, Thompson JA, Ko DJ, et al. Hypercholesterolemia in long-term survivors of heart transplantation: an early marker of accelerated coronary artery disease. *J Heart Lung Transplant*. 1991;10:45-49.
243. Escobar A, Ventura HO, Stapleton DD, et al. Cardiac allograft vasculopathy assessed by intravascular ultrasonography and nonimmunologic risk factors. *Am J Cardiol*. 1994;74:1042-1046.
244. Graham JA, Wilkinson RA, Hirohashi T, et al. Viral infection induces de novo lesions of coronary allograft vasculopathy through a natural killer cell-dependent pathway. *Am J Transplant*. 2009;9:2479-2484.
245. Kendall TJ, Wilson JE, Radio SJ, et al. Cytomegalovirus and other herpesviruses: do they have a role in the development of accelerated coronary arterial disease in human heart allografts? *J Heart Lung Transplant*. 1992;11:S14-20.
246. Fujinami RS, Nelson JA, Walker L, et al. Sequence homology and immunologic cross-reactivity of human cytomegalovirus with HLA-DR beta chain: a means for graft rejection and immunosuppression. *J Virol*. 1988;62:100-105.
247. Fateh-Moghadam S, Bocksch W, Wessely R, et al. Cytomegalovirus infection status predicts progression of heart-transplant vasculopathy. *Transplantation*. 2003;76:1470-1474.
248. Morrissey PE, Monaco AP. Donation after circulatory death: current practices, ongoing challenges, and potential improvements. *Transplantation*. 2014;97:258-264.
249. Cecka JM, Terasaki PI. The UNOS scientific renal transplant registry. United Network for Organ Sharing. *Clin Transpl*. 1995:1-18.
250. Terasaki PI, Cecka JM, Gjertson DW, et al. High survival rates of kidney transplants from spousal and living unrelated donors. *N Engl J Med*. 1995;333:333-336.
251. Pratschke J, Wilhelm MJ, Laskowski I, et al. Influence of donor brain death on chronic rejection of renal transplants in rats. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12:2474-2481.

252. Southard JH, Belzer FO. Organ preservation. *Annu Rev Med.* 1995;46:235-247.
253. Clavien PA, Harvey PR, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation.* 1992;53:957-978.
254. Southard JH, Senzig KA, Belzer FO. Effects of hypothermia on canine kidney mitochondria. *Cryobiology.* 1980;17:148-153.
255. Maathuis MH, Leuvenink HG, Ploeg RJ. Perspectives in organ preservation. *Transplantation.* 2007;83:1289-1298.
256. Erhard J, Lange R, Scherer R, et al. Comparison of histidine-tryptophan-ketoglutarate (HTK) solution versus University of Wisconsin (UW) solution for organ preservation in human liver transplantation. A prospective, randomized study. *Transpl Int.* 1994;7:177-181.
257. Escalante Cobo JL, Río Gallegos Fd. Preservación de órganos. *Medicina Intensiva.* 2009;33:282-292.
258. Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation.* 1988;45:673-676.
259. Mendler N. The meta-physiology of organ preservation. *J Heart Lung Transplant.* 1992;11:S192-195.
260. Ning XH, Chen SH, Xu CS, et al. Hypothermic protection of the ischemic heart via alterations in apoptotic pathways as assessed by gene array analysis. *J Appl Physiol.* 2002;92:2200-2207.
261. Hale SL, Dae MW, Kloner RA. Hypothermia during reperfusion limits 'no-reflow' injury in a rabbit model of acute myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2003;59:715-722.
262. Schneeberger S, Kuznetsov AV, Seiler R, et al. Mitochondrial ischemia-reperfusion injury of the transplanted rat heart: improved protection by preservation versus cardioplegic solutions. *Shock.* 2008;30:365-371.
263. Kuznetsov AV, Schneeberger S, Seiler R, et al. Mitochondrial defects and heterogeneous cytochrome c release after cardiac cold ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286:H1633-1641.
264. Kay L, Daneshrad Z, Saks VA, et al. Alteration in the control of mitochondrial respiration by outer mitochondrial membrane and creatine during heart preservation. *Cardiovasc Res.* 1997;34:547-556.
265. Knight RJ, Dikman S, Liu H, et al. Cold ischemic injury accelerates the progression to chronic rejection in a rat cardiac allograft model. *Transplantation.* 1997;64:1102-1107.

266. Tanaka M, Mokhtari GK, Terry RD, et al. Prolonged cold ischemia in rat cardiac allografts promotes ischemia-reperfusion injury and the development of graft coronary artery disease in a linear fashion. *J Heart Lung Transplant*. 2005;24:1906-1914.
267. Herrero-Fresneda I, Torras J, Cruzado JM, et al. Do alloreactivity and prolonged cold ischemia cause different elementary lesions in chronic allograft nephropathy? *Am J Pathol*. 2003;162:127-137.
268. Kuznetsov AV, Brandacher G, Steurer W, et al. Estimation of mitochondrial damage in heart preservation. *Transplant Proc*. 1999;31:992.
269. See YP, Weisel RD, Mickle DA, et al. Prolonged hypothermic cardiac storage for transplantation. The effects on myocardial metabolism and mitochondrial function. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1992;104:817-824.
270. Duboc D, Abastado P, Muffat-Joly M, et al. Evidence of mitochondrial impairment during cardiac allograft rejection. *Transplantation*. 1990;50:751-755.
271. Barrientos A, Portoles J, Herrero JA, et al. Glomerular hyperfiltration as a nonimmunologic mechanism of progression of chronic renal rejection. *Transplantation*. 1994;57:753-756.
272. Cheigh JS, Mouradian J, Soliman M, et al. Focal segmental glomerulosclerosis in renal transplants. *Am J Kidney Dis*. 1983;2:449-455.
273. Monga G, Mazzucco G, Messina M, et al. Intertubular capillary changes in kidney allografts: a morphologic investigation on 61 renal specimens. *Mod Pathol*. 1992;5:125-130.
274. Ivanyi B, Kemeny E, Rago P, et al. Peritubular capillary basement membrane changes in chronic renal allograft rejection: Comparison of light microscopic and ultrastructural observations. *Virchows Arch*. 2011;459:321-330.
275. Vleming LJ, Baelde JJ, Westendorp RG, et al. Progression of chronic renal disease in humans is associated with the deposition of basement membrane components and decorin in the interstitial extracellular matrix. *Clin Nephrol*. 1995;44:211-219.
276. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int*. 1999;55:713-723.
277. Oni AA, Ray J, Hosenpud JD. Coronary venous intimal thickening in explanted cardiac allografts. Evidence demonstrating that transplant coronary artery disease is a manifestation of a diffuse allograft vasculopathy. *Transplantation*. 1992;53:1247-1251.
278. Arora S, Gullestad L. The challenge of allograft vasculopathy in cardiac transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2014;19:508-514.
279. Johnson DE, Gao SZ, Schroeder JS, et al. The spectrum of coronary artery pathologic findings in human cardiac allografts. *J Heart Transplant*. 1989;8:349-359.

280. Rahmani M, Cruz RP, Granville DJ, et al. Allograft vasculopathy versus atherosclerosis. *Circ Res*. 2006;99:801-815.
281. Behrendt D, Ganz P, Fang JC. Cardiac allograft vasculopathy. *Curr Opin Cardiol*. 2000;15:422-429.
282. Brenner MJ, Tung TH, Jensen JN, et al. The spectrum of complications of immunosuppression: is the time right for hand transplantation? *J Bone Joint Surg Am*. 2002;84-A:1861-1870.
283. Jensen JN, Mackinnon SE. Composite tissue allotransplantation: a comprehensive review of the literature--Part II. *J Reconstr Microsurg*. 2000;16:141-157.
284. Lineaweaver WC. Chronic rejection, hand transplantation, and the monkey's paw. *Microsurgery*. 2006;26:419-420.
285. Ferrara JL, Deeg HJ. Graft-versus-host disease. *N Engl J Med*. 1991;324:667-674.
286. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, et al. Graft-versus-host disease. *Lancet*. 2009;373:1550-1561.
287. Fawcett DW. Sistemas vasculares sanguíneo y linfático. In: Fawcett DW, ed. *Tratado de Histología*. Madrid: McGraw-Hill; 1995:págs:411-418.
288. Salomon RN, Hughes CC, Schoen FJ, et al. Human coronary transplantation-associated arteriosclerosis. Evidence for a chronic immune reaction to activated graft endothelial cells. *Am J Pathol*. 1991;138:791-798.
289. Hruban RH, Beschorner WE, Baumgartner WA, et al. Accelerated arteriosclerosis in heart transplant recipients is associated with a T-lymphocyte-mediated endothelialitis. *Am J Pathol*. 1990;137:871-882.
290. Schwarzacher SP, Uren NG, Ward MR, et al. Determinants of coronary remodeling in transplant coronary disease: a simultaneous intravascular ultrasound and Doppler flow study. *Circulation*. 2000;101:1384-1389.
291. Lim TT, Liang DH, Botas J, et al. Role of compensatory enlargement and shrinkage in transplant coronary artery disease. Serial intravascular ultrasound study. *Circulation*. 1997;95:855-859.
292. Davis SF, Yeung AC, Meredith IT, et al. Early endothelial dysfunction predicts the development of transplant coronary artery disease at 1 year posttransplant. *Circulation*. 1996;93:457-462.
293. Munding GS, Munivenkatappa R, Drachenberg CB, et al. Histopathology of chronic rejection in a nonhuman primate model of vascularized composite allotransplantation. *Transplantation*. 2013;95:1204-1210.
294. Womer KL, Lee RS, Madsen JC, et al. Tolerance and chronic rejection. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2001;356:727-738.

295. Paul LC, Hayry P, Foegh M, et al. Diagnostic criteria for chronic rejection/accelerated graft atherosclerosis in heart and kidney transplants: joint proposal from the Fourth Alexis Carrel Conference on Chronic Rejection and Accelerated Arteriosclerosis in Transplanted Organs. *Transplant Proc.* 1993;25:2022-2023.
296. Massy ZA, Guijarro C, Wiederkehr MR, et al. Chronic renal allograft rejection: immunologic and nonimmunologic risk factors. *Kidney Int.* 1996;49:518-524.
297. Raine AE. Does antihypertensive therapy modify chronic allograft failure? *Kidney Int Suppl.* 1995;52:S107-111.
298. Uretsky BF, Murali S, Reddy PS, et al. Development of coronary artery disease in cardiac transplant patients receiving immunosuppressive therapy with cyclosporine and prednisone. *Circulation.* 1987;76:827-834.
299. Fang JC, Rocco T, Jarcho J, et al. Noninvasive assessment of transplant-associated arteriosclerosis. *Am Heart J.* 1998;135:980-987.
300. Smart FW, Ballantyne CM, Cocanougher B, et al. Insensitivity of noninvasive tests to detect coronary artery vasculopathy after heart transplant. *Am J Cardiol.* 1991;67:243-247.
301. Ciliberto GR, Mangiavacchi M, Banfi F, et al. Coronary artery disease after heart transplantation: non-invasive evaluation with exercise thallium scintigraphy. *Eur Heart J.* 1993;14:226-229.
302. Akosah KO, Mohanty PK, Funai JT, et al. Noninvasive detection of transplant coronary artery disease by dobutamine stress echocardiography. *J Heart Lung Transplant.* 1994;13:1024-1038.
303. Spes CH, Klauss V, Mudra H, et al. Diagnostic and prognostic value of serial dobutamine stress echocardiography for noninvasive assessment of cardiac allograft vasculopathy: a comparison with coronary angiography and intravascular ultrasound. *Circulation.* 1999;100:509-515.
304. Gao SZ, Alderman EL, Schroeder JS, et al. Accelerated coronary vascular disease in the heart transplant patient: coronary arteriographic findings. *J Am Coll Cardiol.* 1988;12:334-340.
305. Spes CH, Klauss V, Rieber J, et al. Functional and morphological findings in heart transplant recipients with a normal coronary angiogram: an analysis by dobutamine stress echocardiography, intracoronary Doppler and intravascular ultrasound. *J Heart Lung Transplant.* 1999;18:391-398.
306. St Goar FG, Pinto FJ, Alderman EL, et al. Detection of coronary atherosclerosis in young adult hearts using intravascular ultrasound. *Circulation.* 1992;86:756-763.
307. Nasu K, Tsuchikane E, Katoh O, et al. Accuracy of in vivo coronary plaque morphology assessment: a validation study of in vivo virtual histology compared with in vitro histopathology. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47:2405-2412.

308. Nair A, Margolis MP, Kuban BD, et al. Automated coronary plaque characterisation with intravascular ultrasound backscatter: ex vivo validation. *EuroIntervention*. 2007;3:113-120.
309. Breidenbach W. What Is the gold standard test for acute (AR) and chronic (CR) rejection in composite tissue allotransplantation (CTA)? American Transplant Congress San Diego; 2010:181.
310. Kaufman CL, Ouseph R, Blair B, et al. Graft vasculopathy in clinical hand transplantation. *Am J Transplant*. 2012;12:1004-1016.
311. Billingham ME. Pathology and etiology of chronic rejection of the heart. *Clin Transplant*. 1994;8:289-292.
312. Tuzcu EM, Kapadia SR, Sachar R, et al. Intravascular ultrasound evidence of angiographically silent progression in coronary atherosclerosis predicts long-term morbidity and mortality after cardiac transplantation. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45:1538-1542.
313. Schmauss D, Weis M. Cardiac allograft vasculopathy: recent developments. *Circulation*. 2008;117:2131-2141.
314. Wu GW, Kobashigawa JA, Fishbein MC, et al. Asymptomatic antibody-mediated rejection after heart transplantation predicts poor outcomes. *J Heart Lung Transplant*. 2009;28:417-422.
315. Kfoury AG, Hammond ME. Controversies in defining cardiac antibody-mediated rejection: need for updated criteria. *J Heart Lung Transplant*. 2010;29:389-394.
316. Kobashigawa J, Crespo-Leiro MG, Ensminger SM, et al. Report from a consensus conference on antibody-mediated rejection in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2011;30:252-269.
317. Cendales LC, Xu H, Bacher J, et al. Composite tissue allotransplantation: development of a preclinical model in nonhuman primates. *Transplantation*. 2005;80:1447-1454.
318. Keogh A. Calcineurin inhibitors in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2004;23:S202-206.
319. Klauss V, Konig A, Spes C, et al. Cyclosporine versus tacrolimus (FK 506) for prevention of cardiac allograft vasculopathy. *Am J Cardiol*. 2000;85:266-269.
320. Meiser BM, Groetzner J, Kaczmarek I, et al. Tacrolimus or cyclosporine: which is the better partner for mycophenolate mofetil in heart transplant recipients? *Transplantation*. 2004;78:591-598.
321. Eisen HJ, Kobashigawa J, Keogh A, et al. Three-year results of a randomized, double-blind, controlled trial of mycophenolate mofetil versus azathioprine in cardiac transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*. 2005;24:517-525.



322. Kobashigawa JA, Tobis JM, Mentzer RM, et al. Mycophenolate mofetil reduces intimal thickness by intravascular ultrasound after heart transplant: reanalysis of the multicenter trial. *Am J Transplant*. 2006;6:993-997.
323. Allison AC, Kowalski WJ, Muller CJ, et al. Mycophenolic acid and brequinar, inhibitors of purine and pyrimidine synthesis, block the glycosylation of adhesion molecules. *Transplant Proc*. 1993;25:67-70.
324. Moon JI, Kim YS, Kim MS, et al. Effect of cyclosporine, mycophenolic acid, and rapamycin on the proliferation of rat aortic vascular smooth muscle cells: in vitro study. *Transplant Proc*. 2000;32:2026-2027.
325. Zuckermann AO, Aliabadi AZ. Calcineurin-inhibitor minimization protocols in heart transplantation. *Transpl Int*. 2009;22:78-89.
326. Eisen HJ, Tuzcu EM, Dorent R, et al. Everolimus for the prevention of allograft rejection and vasculopathy in cardiac-transplant recipients. *N Engl J Med*. 2003;349:847-858.
327. Andreassen AK, Andersson B, Gustafsson F, et al. Everolimus initiation and early calcineurin inhibitor withdrawal in heart transplant recipients: a randomized trial. *Am J Transplant*. 2014;14:1828-1838.
328. Arora S, Andreassen AK, Andersson B, et al. The effect of everolimus initiation and calcineurin inhibitor elimination on cardiac allograft vasculopathy in de novo recipients: one-year results of a Scandinavian randomized trial. *Am J Transplant*. 2015
329. Zuckermann A, Manito N, Epailly E, et al. Multidisciplinary insights on clinical guidance for the use of proliferation signal inhibitors in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2008;27:141-149.
330. Land W, Zweler JL. Prevention of reperfusion-induced, free radical-mediated acute endothelial injury by superoxide dismutase as an effective tool to delay/prevent chronic renal allograft failure: a review. *Transplant Proc*. 1997;29:2567-2568.
331. Myllarniemi M, Raisanen-Sokolowski A, Vuoristo P, et al. Lack of effect of recombinant human superoxide dismutase on cold ischemia-induced arteriosclerosis in syngeneic rat aortic transplants. *Transplantation*. 1996;61:1018-1022.
332. Schroeder JS, Gao SZ, Alderman EL, et al. A preliminary study of diltiazem in the prevention of coronary artery disease in heart-transplant recipients. *N Engl J Med*. 1993;328:164-170.
333. Xue W, Song Y, Tian P, et al. The effects of diltiazem in renal transplantation patients treated with cyclosporine A. *J Biomed Res*. 2010;24:317-323.
334. Kobashigawa JA, Katznelson S, Laks H, et al. Effect of pravastatin on outcomes after cardiac transplantation. *N Engl J Med*. 1995;333:621-627.

335. Wenke K, Meiser B, Thiery J, et al. Simvastatin reduces graft vessel disease and mortality after heart transplantation: a four-year randomized trial. *Circulation*. 1997;96:1398-1402.
336. Mo H, Elson CE. Studies of the isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis applied to cancer chemotherapy and chemoprevention. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2004;229:567-585.
337. Katznelson S, Kobashigawa JA. Dual roles of HMG-CoA reductase inhibitors in solid organ transplantation: lipid lowering and immunosuppression. *Kidney Int Suppl*. 1995;52:S112-115.
338. Halle AA, 3rd, DiSciascio G, Massin EK, et al. Coronary angioplasty, atherectomy and bypass surgery in cardiac transplant recipients. *J Am Coll Cardiol*. 1995;26:120-128.
339. Gao SZ, Schroeder JS, Hunt S, et al. Retransplantation for severe accelerated coronary artery disease in heart transplant recipients. *Am J Cardiol*. 1988;62:876-881.
340. Munding GS, Drachenberg CB. Chronic rejection in vascularized composite allografts. *Curr Opin Organ Transplant*. 2014;19:309-314.
341. Dubernard JM, Owen E, Lefrancois N, et al. First human hand transplantation. Case report. *Transpl Int*. 2000;13 Suppl 1:S521-524.
342. Lanzetta M, Petruzzo P, Vitale G, et al. Human hand transplantation: what have we learned? *Transplant Proc*. 2004;36:664-668.
343. Hofmann GO, Kirschner MH, Wagner FD, et al. Allogeneic vascularized transplantation of human femoral diaphyses and total knee joints--first clinical experiences. *Transplant Proc*. 1998;30:2754-2761.
344. Doi K. Homotransplantation of limbs in rats. A preliminary report on an experimental study with nonspecific immunosuppressive drugs. *Plast Reconstr Surg*. 1979;64:613-621.
345. Siemionow M, Kulahci Y. Experimental models of composite tissue allograft transplants. *Semin Plast Surg*. 2007;21:205-212.
346. Hautz T, Zelger B, Grahammer J, et al. Molecular markers and targeted therapy of skin rejection in composite tissue allotransplantation. *Am J Transplant*. 2010;10:1200-1209.
347. Ozmen S, Ulusal AE, Siemionow M. Proposal to reduce the number of animals used in transplantation research. *Plast Reconstr Surg*. 2003;112:1488-1489.
348. Gercek A, Eti Z, Gogus FY, et al. The analgesic and anti-inflammatory effects of subcutaneous bupivacaine, morphine and tramadol in rats. *Agri*. 2004;16:53-58.

349. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant.* 2008;8:753-760.
350. Alternatives to Animal Use in Research, Testing, and Education. US Congress Office of Technology Assessment Washington, D.C.: U.S. Government Printing Office OTA-BA-273; 1986
351. Animal Care Report. US Department of Agriculture; 2000
352. Wei FC, Mardini, S. Avoiding complications. Flaps and reconstructive surgery. China: W. B. Saunders; 2009;págs:117-124.
353. Solini S, Aiello S, Cassis P, et al. Prolonged cold ischemia accelerates cellular and humoral chronic rejection in a rat model of kidney allotransplantation. *Transpl Int.* 2012;25:347-356.
354. Xiao B, Xia W, Zhang J, et al. Prolonged cold ischemic time results in increased acute rejection in a rat allotransplantation model. *J Surg Res.* 2010;164:e299-304.
355. Medling BD, Bueno RA, Jr., Russell RC, et al. Replantation outcomes. *Clin Plast Surg.* 2007;34:177-185.
356. Sabapathy SR, Venkatramani H, Bharathi RR, et al. Replantation surgery. *J Hand Surg Am.* 2011;36:1104-1110.
357. Tantry TP, Kadam D, Shenoy SP, et al. Perioperative evaluation and outcomes of major limb replantations with ischemia periods of more than 6 hours. *J Reconstr Microsurg.* 2013;29:165-172.
358. White E, Hildemann WH. Allografts in genetically defined rats: difference in survival between kidney and skin. *Science.* 1968;162:1293-1295.
359. Tadwalkar RV, Lee MS. Unprotected left main coronary artery percutaneous coronary intervention in a pediatric patient with cardiac allograft vasculopathy. *J Invasive Cardiol.* 2014;26:E156-160.
360. Del Rizzo DF, Menkis AH, Pflugfelder PW, et al. The role of donor age and ischemic time on survival following orthotopic heart transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 1999;18:310-319.
361. Armstrong AT, Strauch AR, Starling RC, et al. Morphometric analysis of neointimal formation in murine cardiac grafts: III. Dissociation of interstitial fibrosis from neointimal formation. *Transplantation.* 1997;64:1198-1202.
362. Rowan RA, Billingham ME. Pathologic changes in the long-term transplanted heart: a morphometric study of myocardial hypertrophy, vascularity, and fibrosis. *Hum Pathol.* 1990;21:767-772.

363. Tazelaar HD, Edwards WD. Pathology of cardiac transplantation: recipient hearts (chronic heart failure) and donor hearts (acute and chronic rejection). *Mayo Clin Proc.* 1992;67:685-696.
364. Swearingen B, Ravindra K, Xu H, et al. Science of composite tissue allotransplantation. *Transplantation.* 2008;86:627-635.
365. Hosenpud JD, Everett JP, Morris TE, et al. Cardiac allograft vasculopathy. Association with cell-mediated but not humoral alloimmunity to donor-specific vascular endothelium. *Circulation.* 1995;92:205-211.
366. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today.* 1996;17:138-146.
367. Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M, et al. Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:695-700.
368. Kitchens WH, Chase CM, Uehara S, et al. Macrophage depletion suppresses cardiac allograft vasculopathy in mice. *Am J Transplant.* 2007;7:2675-2682.
369. Wyburn KR, Jose MD, Wu H, et al. The role of macrophages in allograft rejection. *Transplantation.* 2005;80:1641-1647.
370. Jiang X, Khan MA, Tian W, et al. Adenovirus-mediated HIF-1alpha gene transfer promotes repair of mouse airway allograft microvasculature and attenuates chronic rejection. *J Clin Invest.* 2011;121:2336-2349.
371. Turnquist HR, Raimondi G, Zahorchak AF, et al. Rapamycin-conditioned dendritic cells are poor stimulators of allogeneic CD4+ T cells, but enrich for antigen-specific Foxp3+ T regulatory cells and promote organ transplant tolerance. *J Immunol.* 2007;178:7018-7031.
372. Ehrchen J, Steinmuller L, Barczyk K, et al. Glucocorticoids induce differentiation of a specifically activated, anti-inflammatory subtype of human monocytes. *Blood.* 2007;109:1265-1274.
373. Rose EA, Pepino P, Barr ML, et al. Relation of HLA antibodies and graft atherosclerosis in human cardiac allograft recipients. *J Heart Lung Transplant.* 1992;11:S120-123.
374. Suciu-Foca N, Reed E, Marboe C, et al. The role of anti-HLA antibodies in heart transplantation. *Transplantation.* 1991;51:716-724.
375. Dunn MJ, Crisp SJ, Rose ML, et al. Anti-endothelial antibodies and coronary artery disease after cardiac transplantation. *Lancet.* 1992;339:1566-1570.
376. Hosenpud JD, Mauck KA, Hogan KB. Cardiac allograft vasculopathy: IgM antibody responses to donor-specific vascular endothelium. *Transplantation.* 1997;63:1602-1606.

377. Minami K, Murata K, Lee CY, et al. C4d deposition and clearance in cardiac transplants correlates with alloantibody levels and rejection in rats. *Am J Transplant.* 2006;6:923-932.
378. Colvin RB. C4d in liver allografts: a sign of antibody-mediated rejection? *Am J Transplant.* 2006;6:447-448.
379. Smith JD, Lawson C, Yacoub MH, et al. Activation of NF-kappa B in human endothelial cells induced by monoclonal and allospecific HLA antibodies. *Int Immunol.* 2000;12:563-571.
380. Coupel S, Leboeuf F, Boulday G, et al. RhoA activation mediates phosphatidylinositol 3-kinase-dependent proliferation of human vascular endothelial cells: an alloimmune mechanism of chronic allograft nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15:2429-2439.
381. Benzaquen LR, Nicholson-Weller A, Halperin JA. Terminal complement proteins C5b-9 release basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor from endothelial cells. *J Exp Med.* 1994;179:985-992.
382. Saadi S, Holzknecht RA, Patte CP, et al. Endothelial cell activation by pore-forming structures: pivotal role for interleukin-1alpha. *Circulation.* 2000;101:1867-1873.



## **8 RESUMEN.**





## **INTRODUCCIÓN**

El rechazo crónico (RC) está descrito en trasplante de órgano sólido, siendo la causa más prevalente de fracaso tardío de un órgano trasplantado. En 2009 se produjo el primer caso de RC en un trasplante de tejidos compuestos (TTC), un trasplante de mano realizado en Louisville en 2008 que requirió la amputación del aloinjerto. Estudios clínicos y experimentales han demostrado que la isquemia fría pretrasplante o preservación en hipotermia, estimula el desarrollo de la vasculopatía crónica del aloinjerto (VCA) y afecta negativamente a la supervivencia del mismo.

## **OBJETIVO**

Valorar el efecto de la preservación en frío sobre el desarrollo de la VCA en comparación con el trasplante inmediato, en el contexto de un TTC experimental de extremidad posterior en ratas bajo dosis subterapéuticas de inmunosupresión.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Se realizaron un total de 30 trasplantes de pata entre ratas cruzando el complejo mayor de histocompatibilidad. Ratas Lewis Brown-Norway fueron utilizadas como donantes (LBN RT1<sup>n</sup>) y Wistar-Lewis como receptoras (LEW RT1<sup>l</sup>), mediante una técnica modificada de trasplante heterotópico con enterramiento sin piel. Se mantuvieron con inmunosupresión diaria a dosis subterapéuticas (Ciclosporina A 2mg/Kg/día la primera semana postoperatoria, y 1mg/Kg/día las siguientes). Se valoraron los cambios producidos por el RC y la preservación en frío transcurridos 2 meses desde el trasplante en los dos grupos experimentales; trasplante inmediato (<1 hora de isquemia) frente a trasplante tras 7 horas de isquemia fría a 4°C.

Se valoró la supervivencia de los animales y el tiempo de intervención quirúrgica. El estudio del efecto se realizó a nivel histológico evaluando los cambios vasculares (presencia de vasculopatía, proliferación intimal [PI] y porcentaje de permeabilidad arterial [PPA]), el infiltrado linfocitario y la presencia de fibrosis en distintos tejidos del TTC. Se valoró inmunohistoquímicamente (IHQ) la presencia de infiltrados CD3<sup>+</sup> (LT), CD4<sup>+</sup> (LT “helper”), CD8<sup>+</sup> (LT citotóxico), CD20<sup>+</sup> (LB) y CD68<sup>+</sup> (macrófagos), así como el depósito intravascular de la fracción del complemento C4d. Para estudiar la expresión génica se realizó un análisis por PCR cuantitativa de las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10.

## RESULTADOS

Se logró una supervivencia del 40% de las ratas intervenidas, con un tiempo medio de intervención de 181 minutos, recuperándose 12 aloinjertos vascularizados. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar la media de PI en los vasos de gran calibre (16,13% vs 52,44%), así como el PPA (87,60% vs 60,91%), entre el grupo de trasplante inmediato y el de la preservación en frío ( $P = 0,004$  en ambos casos). El PPA también presentó diferencias significativas en el grupo con frío al comparar el tercio medio del muslo y el tercio distal ( $P = 0,004$  y  $0,016$  respectivamente). El porcentaje de permeabilidad disminuyó de manera significativa ( $P = 0,047$ ) a medida que nos desplazamos distalmente en el árbol vascular. Se detectó un mayor número de vasos de pequeño y mediano calibre patológicos en las muestras sometidas a isquemia fría en ambos tercios musculares ( $P = 0,007$  y  $0,004$  respectivamente). La IHQ presentó diferencias significativas para los infiltrados celulares CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup> y CD68<sup>+</sup> en el grupo sometido a preservación en frío ( $P < 0,05$  en todos los casos). Los depósitos de C4d presentaron una tendencia cercana a la

significación ( $P = 0,059$ ). El análisis de las distintas citoquinas no encontró diferencias entre los grupos de experimentación.

## **CONCLUSIONES**

Con este trabajo se demuestra la asociación de la preservación en isquemia fría y la VCA en el contexto de un TTC experimental. Tanto la intensidad de la misma, como su extensión y progresión distal, están relacionadas con el frío de manera significativa. La fibrosis y el infiltrado linfocitario a nivel de los tejidos más profundos, pueden ser marcadores de la intensidad del rechazo, pero su impacto exacto en el contexto de un TTC clínico así como su relación con la preservación en frío aún no está claro. Los resultados de la IHQ apoyan estas conclusiones y son concordantes con los resultados del análisis morfológico. El modelo experimental de trasplante de pata en rata a dosis infraterapéuticas de inmunosupresión es un modelo reproducible de rechazo crónico.



## **9 ANEXOS.**



## **9.1 PREMIOS DERIVADOS DE LA PRESENTE TESIS.**

1. Segundo premio en el Concurso Internacional de residentes del XX Congreso de la Federación Ibero Latinoamericana de Cirugía Plástica, celebrado en Cancún en Septiembre de 2014, con el trabajo: “Efecto de la preservación en frío sobre el rechazo crónico en el modelo de trasplante de extremidad posterior en ratas”.
2. Ganador del premio nacional de residentes en el 48º Congreso de la SECPRE, celebrado en Tenerife en Junio de 2013, con el trabajo: “Efecto de la preservación en frío sobre el rechazo crónico en el modelo de trasplante de extremidad posterior en ratas”.

## **9.2 BECAS CONCEDIDAS A LA PRESENTE TESIS.**

Beca de 12.000 euros concedida por la fundación IdiPaz, dentro de la “Convocatoria IdiPaz/FIBHULP de ayudas a grupos de investigación emergentes” del año 2011. Título del proyecto: “Efecto de la preservación en frío sobre el rechazo crónico en el modelo de trasplante de extremidad posterior en ratas.” Director: Dr. Luis Landín Jarillo.





### 9.3 PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA PRESENTE TESIS

1. Bonastre-Juliá, J., Landín-Jarillo, L., Casado-Pérez, C. Preservación en frío y rechazo crónico, desarrollo de un modelo de trasplante de extremidad posterior en ratas. *Cir plást iberolatinoam*. 2015;41(1):1-10.
2. Bonastre J, Landin L, Diez J, Casado-Sanchez C, Casado-Perez C. Factors influencing acute rejection of human hand allografts: a systematic review. *Ann Plast Surg*. 2012;68(6):624-9.DOI: 10.1097/SAP.0b013e318255a411.
3. Landin L, Bonastre J, Casado-Sanchez C, Diez J, Ninkovic M, Lanzetta M, del Benne M, Schneeberger S, Hautz T, Lovic A, Leyva F, García-de-Lorenzo A, Casado-Perez C. Outcomes with respect to disabilities of the upper limb after hand allograft transplantation: a systematic review. *Transpl Int*. 2012;25(4):424-32. DOI: 10.1111/j.1432-2277.2012.01433.x.



## **9.4 COMUNICACIONES A CONGRESOS DERIVADAS DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL.**

1. Comunicación oral al XX Congreso de la Federación Ibero Latinoamericana de Cirugía Plástica (FILACP), dentro del concurso internacional de residentes, Cancún 2014: “Efecto de la preservación en frío sobre el rechazo crónico en el modelo de trasplante de extremidad posterior en ratas”. Bonastre J. Comunicación ganadora del Accésit al Premio Internacional de Residentes 2014.
2. Comunicación oral al XIX Congreso de la Sociedad Española de Investigaciones Quirúrgicas (SEIQ), Madrid 2013: “Vasculopatía fibroproliferativa e isquemia fría en el trasplante de pata en rata”. Bonastre J, Landin L, Casado-Pérez C.
3. Comunicación oral al XLVIII Congreso de la Sociedad Española de Cirugía Plástica, Estética y Reparadora (SECPRE), Tenerife 2013: “Efecto de la preservación en frío sobre el rechazo crónico en el modelo de trasplante de extremidad posterior en ratas”. Bonastre J. Comunicación ganadora del Premio Mentor de Residentes 2013.
4. Póster al XVIII Congreso de la Sociedad Española de Investigaciones Quirúrgicas (SEIQ), León 2012: “Factores que afectan al rechazo agudo en trasplante de aloinjertos de mano”. Bonastre J, Landin L.
5. Comunicación oral al XLVII Congreso de la Sociedad Española de Cirugía Plástica, Estética y Reparadora (SECPRE), Palma de Mallorca 2012: “Revisión sistemática de resultados en la discapacidad de miembro superior en trasplante de mano”. Bonastre J, Landin L, Diez J, Casado-Sánchez C, Casado-Pérez C.

6. Comunicación oral al XLVII Congreso de la Sociedad Española de Cirugía Plástica, Estética y Reparadora (SECPRE), Palma de Mallorca 2012: “Revisión sistemática de factores desencadenantes del rechazo agudo en trasplantes de mano”. Bonastre J, Landin L, Diez J, Casado-Sánchez C, Casado-Pérez C.
7. Comunicación oral al 49 Congreso de la Sociedad Española de medicina física y rehabilitación (SERMEF), Toledo 2011: “Trasplante de manos, una mejoría en la discapacidad de miembro superior”. Landin L, Bonastre J, Casado-Pérez C.

## 9.5 NOTAS, PERMISOS Y DERECHOS DE AUTOR.

El presente trabajo ha sido ejecutado en el Instituto de Investigación del Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ) de Madrid. Ha contado con la aprobación del Comité Ético de Bienestar Animal (CEBA) de dicho hospital con fecha de 28 de Abril de 2011 (número de proyecto CEBA-09-2011), certificando el cumplimiento de la normativa vigente en experimentación animal (directiva del Consejo de Europa publicada el 22 de septiembre de 2010; 2010/63/UE).

No existe relación comercial ni financiera entre el presente trabajo, su autor y colaboradores y los productos que en él se enumeran. La medicación inmunosupresora fue suministrada de forma gratuita por el propio IdiPAZ.

Las imágenes no originales contenidas en la presente tesis se publican con permiso de las editoriales propietarias de sus derechos de autor (Elsevier, Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins, Massachusetts Medical Society y John Wiley and Sons). Los derechos para su uso en esta tesis han sido cedidos por Rightslink con números de licencia 3594780676081, 3594780055099, 3551440885459, 3594790391663, 3594781395723, 3596091122326, 3596131157638 y 3601310215098.



